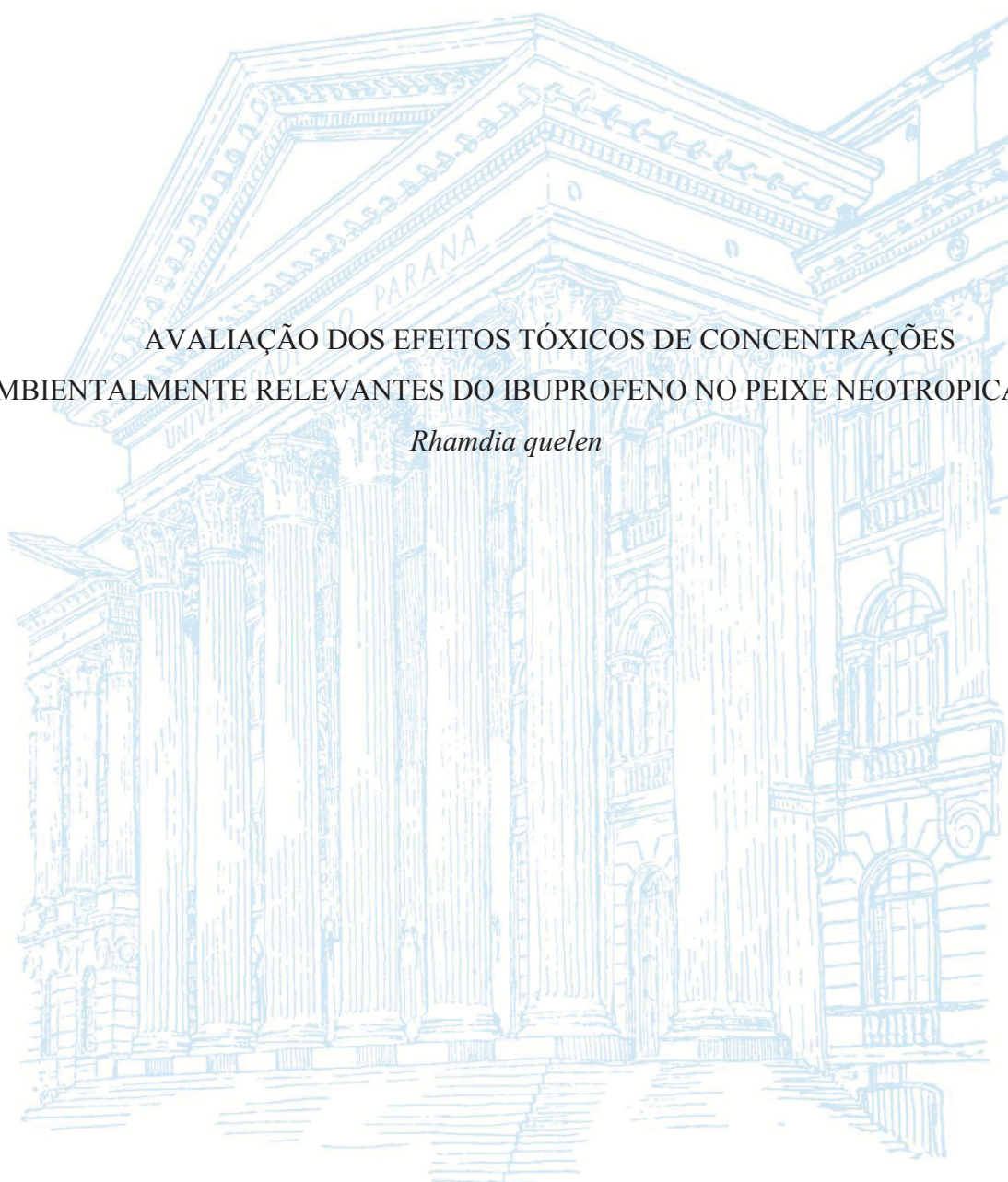


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLE TATIANA MATHIAS

AValiação dos efeitos tóxicos de concentrações
ambientalmente relevantes do ibuprofeno no peixe neotropical

Rhamdia quelen



CURITIBA

2018

FRANCIELLE TATIANA MATHIAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES
AMBIENTALMENTE RELEVANTES DO IBUPROFENO NO PEIXE NEOTROPICAL
Rhamdia quelen

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, no
Programa de Pós Graduação em Farmacologia,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Cristina da Silva
de Assis

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Mathias, Francielle Tatiana

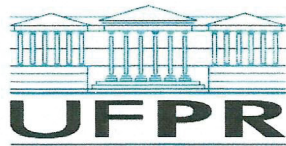
Avaliação dos efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes do ibuprofeno no peixe neotropical *Rhamdia quelen*. / Francielle Tatiana Mathias. – Curitiba, 2018.

115 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Helena Cristina da Silva de Assis
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Peixes. 2. Biomarcadores. 3. Ibuprofeno. I. Título II. Assis, Helena Cristina da Silva de Assis. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIELLE TATIANA MATHIAS** intitulada: **Avaliação dos Efeitos Tóxicos de Concentrações Ambientalmente Relevantes do Ibuprofeno no Peixe Neotropical Rhamdia quelen**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 04 de Maio de 2018.

HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS
Presidente da Banca Examinadora

RENATA MARINO ROMANO
Avaliador Externo

IZONETE CRISTINA GUILOSKI
Avaliador Externo

CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA
Avaliador Externo

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Avaliador Interno

Dedico esse trabalho ao meu pai Amauri Antonio
Mathias (*in memoriam*), por quem meu coração
transborda amor hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para alcançar meus objetivos.

A minha família, minha mãe Elisabet, meu irmão Jefferson e minha avó Angelina, por todo amor, apoio e confiança em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo Taylor Savegnago, pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo, que tornaram os anos de dedicação ao doutorado mais leves.

A Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, pela orientação, dedicação do seu tempo e conhecimentos e por todos os ensinamentos durante o Doutorado.

As minhas colegas de laboratório e amigas, Sabrina Calado, Izonete Guiloski, Maiara Vicentini, Maiara Perussolo, Mayara Rodrigues, Talita Pires e Lilian Salgado por toda a ajuda com a parte prática dos experimentos, pelas discussões sobre os resultados, pelo convívio diário. Tudo isso me permitiu aprender com louvor o significado de trabalho em equipe.

A minha amiga e colega de laboratório Letícia Pereira, por toda ajuda na parte experimental, teórica, por compartilhar seus conhecimentos comigo, pela ajuda em todos os percalços, pela amizade incondicional.

A Larissa Vuitika e Marianna Boia Ferreira, por todo o auxílio com a expressão gênica.

Aos colegas do Doutorado, pelas conversas e trocas de experiências.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, por compartilhar sua sabedoria e suas experiências, e aos funcionários, por permitirem a execução dos nossos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e a Universidade Federal do Paraná, pelo acolhimento e formação.

Aos professores integrantes da banca examinadora, Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, Dra. Renata Marino Romano, Dr. Anderson Joel Martino Andrade, Dra. Izonete Cristina Guiloski e Dra. Juliana Geremias Chichorro, por aceitar avaliar meu trabalho e pelas valiosas contribuições.

A todas as pessoas que contribuíram e apoiaram de alguma maneira a execução desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O aumento do consumo, da comercialização e da produção de medicamentos resulta em sua detecção no meio aquático e em impactos ambientais. A classe dos medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) é frequentemente detectada nos corpos hídricos devido à ampla utilização pela população. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do AINE ibuprofeno nas concentrações 0, 0,1, 1,0 e 10 µg/L em peixes machos da espécie *Rhamdia quelen*. Os peixes foram expostos ao ibuprofeno por via hídrica durante 14 dias, com troca de metade da água dos aquários diariamente e reposição do fármaco no volume adequado para manter a concentração inicial. Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados, eutanasiados e os tecidos foram retirados para avaliação dos biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade, osmorregulatórios, hematológicos e de desregulação endócrina. Os resultados demonstraram que no rim posterior, o ibuprofeno aumentou a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) em todos os grupos expostos. Além disso, aumentou a atividade da glutathione peroxidase (GPx) e os níveis de glutathione reduzida (GSH) no grupo exposto a 10 µg/L. No fígado e na brânquia não foram observadas alterações bioquímicas e o índice hepatossomático também não foi alterado. Os biomarcadores osmorregulatórios demonstraram uma diminuição na atividade da anidrase carbônica no rim posterior em todos os grupos expostos e um aumento na atividade da anidrase carbônica nas brânquias no grupo exposto a 0,1 µg/L. Houve ainda um aumento nos níveis de magnésio plasmático nos grupos expostos a 0,1 e 1 µg /L. O ibuprofeno não foi genotóxico para o sangue, fígado e rim posterior. No sangue, o ibuprofeno diminuiu o número de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e trombócitos em grupos expostos a 0,1 e 1,0 µg/L. No cérebro, o fármaco aumentou a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no grupo exposto a concentração de 1,0 µg/L. Os biomarcadores de desregulação endócrina mostraram que o ibuprofeno diminuiu a expressão da aromatase cerebral (*cyp19a1b*) de forma concentração dependente. Os níveis dos hormônios testosterona e estradiol não foram afetados. Na gônada, o ibuprofeno não causou estresse oxidativo, mas diminuiu a atividade da enzima GST no grupo exposto a 10 µg/L. Alterações histopatológicas, no índice gonadossomático e genotoxicidade não foram observadas nas gônadas. Os resultados demonstraram que o ibuprofeno em concentrações ambientalmente relevantes causou nefrotoxicidade, imunossupressão e apresentou um potencial efeito como desregulador endócrino em *Rhamdia quelen*.

Palavras chave: AINEs. Fármacos. Contaminantes emergentes. Peixes. Biomarcadores. Desregulação endócrina.

ABSTRACT

The increase in consumption, marketing and production of pharmaceuticals results in their detection in the aquatic ecosystem and in environmental impacts. The class of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is often detected in water bodies due to the widespread use by the population. The aim of this study was to evaluate the toxic effects of the NSAID ibuprofen at concentrations of 0, 0.1, 1.0 and 10 µg/L on male fish *Rhamdia quelen*. The fish were exposed to the ibuprofen by water during 14 days, a half of water of the aquarium was exchanged daily and the drug was replaced to keep the initial concentration. After the exposure time, the fish were anesthetized, euthanized and the tissues were sampled for biochemical, genotoxic, osmoregulatory, hematological and endocrine disruption biomarkers evaluation. The results demonstrated that in the posterior kidney, ibuprofen increased the activity of the glutathione S-transferase (GST) in all exposed groups. In addition, it increased the activity of glutathione peroxidase (GPx) and the levels of reduced glutathione (GSH) in the group exposed to 10 µg/L. Biochemical changes were not observed in the liver and gills, and the hepatosomatic index was not altered. The osmoregulatory biomarkers demonstrated a decrease in carbonic anhydrase activity in the posterior kidney in all exposed groups and an increase in the activity of carbonic anhydrase in the gills in the group exposed to 0.1 µg/L. There was also an increase in plasma magnesium levels in the groups exposed to 0.1 and 1 µg/L. The ibuprofen was not genotoxic to the blood, liver and posterior kidney. In the blood, ibuprofen decreased the count number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes and thrombocytes in groups exposed to 0.1 and 1.0 µg/L. In the brain, the drug increased the activity of the enzyme acetylcholinesterase in the group exposed to the concentration of 1.0 µg/L. The endocrine disruption biomarkers showed that ibuprofen down-regulated brain aromatase expression (*cyp19a1b*) in a concentration-dependent manner. The levels of the hormones testosterone and estradiol were not affected. In the gonad, ibuprofen did not cause oxidative stress, but decreased the activity of the enzyme GST in the group exposed to 10 µg/L. Histopathological and gonadosomatic index changes and genotoxicity were not observed in the gonads. The results demonstrated that ibuprofen in environmental relevant concentrations caused nephrotoxicity, immunosuppression and showed a potential effect as endocrine disruptor in *Rhamdia quelen*.

Keywords: NSAIDs. Drugs. Emerging contaminants. Fish. Biomarkers. Endocrine disruption.

APRESENTAÇÃO

Essa tese inicia com uma introdução, seguida de revisão de literatura e objetivos. Na sequência estão apresentados dois capítulos, referentes aos artigos científicos gerados com os resultados, intitulados:

Capítulo I - Avaliação dos efeitos tóxicos do ibuprofeno em peixes machos da espécie *Rhamdia quelen*

Capítulo II - Avaliação do potencial efeito desregulador endócrino do ibuprofeno em peixes machos *Rhamdia quelen*

Na sequência há um tópico de discussão geral sobre os resultados e um sobre as conclusões do trabalho, seguido pelas referências utilizadas na introdução, revisão de literatura e discussão geral. As referências utilizadas nos artigos seguem no final de cada um deles.

As listas de figuras, tabelas e siglas referem-se ao conteúdo apresentado na introdução, revisão de literatura, discussão geral e artigos científicos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- FONTES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR MEDICAMENTOS.....	20
FIGURA 2	- ESTRUTURA QUÍMICA DO IBUPROFENO.....	27
FIGURA 3	- EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADA-FÍGADO (HPGF) EM PEIXES TELEÓSTEOS.....	38
FIGURA 4	- EXEMPLAR DE <i>Rhamdia quelen</i>	42
CAPÍTULO I		
FIGURE 1	- BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN POSTERIOR KIDNEY AND IN BRAIN OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN.....	55
FIGURE 2	- OSMOREGULATION BIOMARKERS IN <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	56
CAPÍTULO II		
FIGURE 1	- RELATIVE EXPRESSION OF BRAIN AROMATASE (<i>cyp19a1b</i>) in HYPOTHALAMUS OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	79
FIGURE 2	- HORMONAL PLASMA CONCENTRATIONS IN <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABLE 1	- WATER IBUPROFEN CONCENTRATIONS IN GROUP EXPOSED TO 10 µg/L DURING THE BIOASSAY	54
TABLE 2	- HEMATOLOGICAL BIOMARKER IN <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	57
TABLE S1	- BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LIVER OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	62
TABLE S2	- BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE GILLS OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	62
TABLE S3	- GENETIC BIOMARKERS IN <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	62

CAPÍTULO II

TABLE 1	- HISTOPATHOLOGY AND GSI IN GONAD OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	80
TABLE 2	- BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE GONAD OF <i>R. quelen</i> EXPOSED TO IBUPROFEN	81

LISTA DE SIGLAS

AChE	- Acetilcolinesterase
AChE	- Acetylcholinesterase
AhR	- Receptor de aril hidrocarboneto
AINÉ	- Anti-inflamatório não esteroideal
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroideais
ALFAC	- ethanol, formaldehyde, acetic acid
ANOVA	- One-way analysis of variance
BHT	- Butylated hydroxytoluene
CAA	- Carbonic anhydrase activity
CAT	- Catalase
CDNB	- 1-chloro-2,4-nitrobenzene
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX	- Ciclo-oxigenase
cyp19a1a	- Aromatase gonadal
cyp19a1b	- Aromatase cerebral
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EROD	- Etoxisorufina-O-deetilase
EROD	- Ethoxyresorufin-O-deethylase
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPx	- Glutathione peroxidase
GPx	- Glutathione peroxidase
GSH	- Glutathione reduzida
GSH	- Reduced glutathione
GSI	- Gonadosomatic index
GSSG	- Glutathione oxidada
GST	- Glutathione-S-transferase
GST	- Glutathione-S-transferase
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HPGF	- Hipotálamo-pituitária-gônada-fígado

HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
HSI	- Hepatosomatic index
IBU-CBX	- Carboxi-ibuprofeno
IBU-OH	- Hidroxi-ibuprofeno
IGS	- Índice gonadossomático
IHS	- Índice hepatossomático
LH	- Hormônio luteinizante
LPO	- Lipid peroxidation
NADPH	- Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	- Nuclear factor kappa B
NSAID	- Non-steroidal anti-inflammatory drug
NSAIDs	- Non-steroidal anti-inflammatory drugs
NTC	- Non-template control
PCO	- Protein carbonyl
PGD ₂	- Prostaglandina D2
PGE ₂	- Prostaglandina E2
PGF ₂	- Prostaglandina F2
PGH ₂	- Prostaglandina H2
PGHS	- Prostaglandina H2 sintase
PGI ₂	- Prostaciclina
PLA ₂	- Fosfolipase A2
PMNT	- Piscine micronucleus test
PPARs	- Peroxisome proliferator-activated receptors
PPAR _γ	- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
qPCR	- Polymerase chain reaction
ROS	- Reactive oxygen species
RDC	- Resolução de Diretoria Colegiada
RTC	- Reverse transcription control
SOD	- Superóxido dismutase
SOD	- Superoxide dismutase
TCA	- Trichloroacetic acid
TXA ₂	- Tromboxanos
VTG	- Vitelogenina

UDPGT - Uridina-5-difosfato glucuroniltransferase
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	MEDICAMENTOS NO MEIO AMBIENTE	19
2.1.1	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	24
2.1.1.1	Ibuprofeno	26
2.2	BIOMARCADORES	29
2.2.1	Biomarcadores bioquímicos	30
2.2.2	Biomarcadores de genotoxicidade	33
2.2.3	Biomarcadores osmorregulatórios	34
2.2.4	Biomarcadores hematológicos	35
2.2.5	Biomarcadores de desregulação endócrina	36
2.3	MODELO DE ESTUDO: <i>Rhamdia quelen</i>	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
	CAPÍTULO I	45
	Abstract	46
1	Introduction	46
2	Material and Methods	48
2.1	Animals	48
2.2	Bioassay	49
2.3	Ibuprofen chemical analysis	49
2.3.1	Definition of drug replacement time	49
2.3.2	Ibuprofen concentration during the bioassay	50
2.4	Biochemical biomarkers	50

2.5	Biomarkers for genotoxicity	51
2.6	Osmoregulation biomarkers	52
2.7	Hematological biomarker	52
2.8	Statistical analysis	52
3	Results	53
3.1	Bioassay	53
3.2	Chemical analysis	53
3.2.1	Definition of drug replacement time	53
3.3	Biochemical biomarkers	54
3.4	Biomarkers for genotoxicity	54
3.5	Osmoregulation biomarkers	56
3.6	Hematological biomarker	56
4	Discussion	57
5	Conclusion	61
	Acknowledgements	61
	References	63
	CAPÍTULO II	71
	Abstract	72
1	Introduction	72
2	Material and Methods	74
2.1	Experimental design	74
2.2	RT-qPCR: Brain aromatase (<i>cyp19a1b</i>) expression	75
2.3	Hormonal analyses	76
2.4	Histopathological biomarker and gonadosomatic index (GSI)	76
2.5	Biochemical biomarkers	76
2.6	Biomarker for genotoxicity	78
2.7	Statistical analysis	78

3	Results	78
3.1	Experimental design	79
3.2	Brain aromatase (<i>cyp19a1b</i>) expression.....	79
3.3	Hormonal analyses	79
3.4	Histopathological biomarker and GSI.....	80
3.5	Biochemical biomarkers	80
3.6	Genotoxicity biomarker	81
4	Discussion	81
5	Conclusion	84
	Acknowledgements	84
4	DISCUSSÃO GERAL	91
5	CONCLUSÕES GERAIS	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

A contaminação da água por medicamentos é hoje um reconhecido problema de impacto ambiental. Ao longo dos últimos anos, houve uma crescente conscientização sobre a presença não intencional desses compostos no meio aquático e as consequências negativas que podem ser geradas aos ecossistemas (EBELE; ABOU-ELWAFABDALLAH; HARRAD, 2017). Dentro das ciências ambientais, os trabalhos mais citados abordam medicamentos e meio ambiente, demonstrando a importância do tema (DAUGHTON, 2016).

Um agravante desta problemática é o aumento do consumo de medicamentos a nível mundial e também nacional. O Brasil está entre os dez países que mais consomem produtos farmacêuticos no mundo, e as previsões de consumo demonstram que a tendência do país é ficar nas primeiras posições (IMS, 2013). Esse aumento do consumo resulta em aumento na quantidade de fármacos em corpos hídricos, devido à ausência de tratamentos eficientes para a retirada dessas substâncias do sistema de esgoto e do descarte inadequado pela população (SANTOS et al., 2010). Esses fatores levam a detecção dos fármacos em águas superficiais, águas subterrâneas e até mesmo água potável (KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009; DOUGHERTY et al., 2010; SUN et al., 2015).

Dentre as diversas classes terapêuticas presentes no ambiente aquático, destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) em relação ao impacto ambiental. Os AINEs são a classe de medicamentos sem prescrição médica mais vendida em todo o mundo, e devido a sua ampla utilização são frequentemente detectados nos corpos hídricos (SOUSA et al., 2018). O ibuprofeno pertence a essa classe, atua diminuindo a formação de prostaglandinas, envolvidas nos sintomas de dor e inflamação (GRAVEL et al., 2009). Em peixes, as prostaglandinas apresentam uma variedade de papéis fisiológicos importantes para o pleno desenvolvimento do organismo (JEFFRIES et al., 2015). Assim a contaminação ambiental de águas com AINEs pode afetar a fisiologia de animais aquáticos e consequentemente causar toxicidade.

Embora a literatura sobre o ibuprofeno seja ampla, pouca informação está disponível em relação aos efeitos sistêmicos e reprodutivos do fármaco em peixes neotropicais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do ibuprofeno em concentrações ambientalmente relevantes no peixe neotropical *Rhamdia quelen*, utilizando biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade, osmorregulatórios, hematológicos e de desregulação endócrina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEDICAMENTOS NO MEIO AMBIENTE

Nas últimas décadas, o consumo de medicamentos tem aumentado assim como sua detecção em efluentes e águas superficiais, o que representa uma grande preocupação em relação ao impacto que pode ser causado ao meio ambiente e a saúde humana (SANTOS et al., 2013). Os medicamentos são considerados contaminantes emergentes, definidos como qualquer químico de ocorrência natural ou sintética, que não são comumente monitorados, mas tem o potencial de entrar no ambiente e causar efeitos adversos desconhecidos (KUSTER et al., 2008; FERREIRA, 2014).

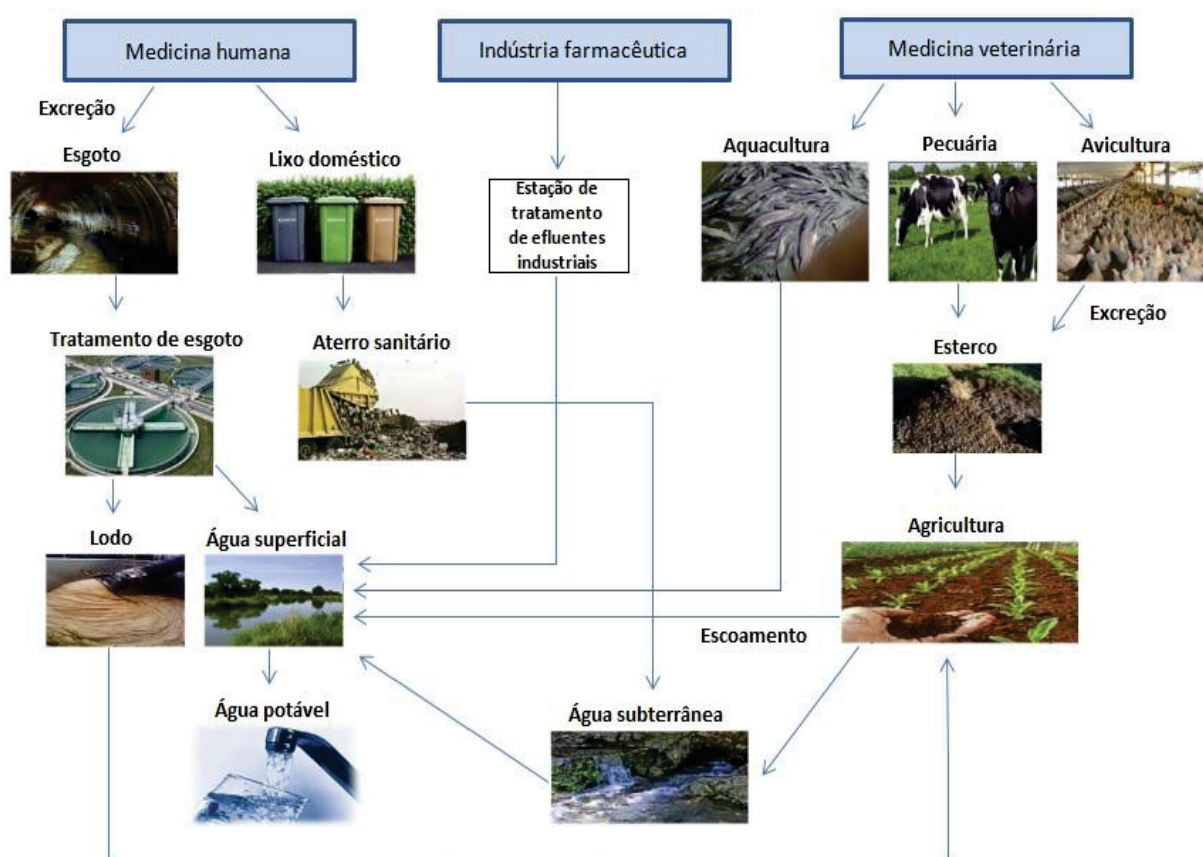
O aumento do consumo, da comercialização e da produção de medicamentos vem resultando na detecção cada vez mais frequente dessas substâncias em compartimentos aquáticos. Diversos trabalhos tem demonstrado a detecção de fármacos em águas superficiais como rios, lagos e estuários (FENT; ESCHER; CAMINADA, 2006; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009), em efluentes (FANG et al., 2012), na água do mar (LOLIĆ et al., 2015), em águas subterrâneas (DOUGHERTY et al., 2010) e na água potável (SUN et al., 2015). Nesses locais, são encontrados em baixos níveis, na faixa de $\mu\text{g/L}$ ou ng/L , sendo considerados micropoluentes (FERREIRA, 2014).

De forma geral, todos os medicamentos utilizados pela população podem chegar aos corpos hídricos. São encontradas as mais diversas classes, dentre elas antibióticos, contraceptivos, anti-inflamatórios não esteroidais, beta bloqueadores, antidepressivos, ansiolíticos, antiepiléticos, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes e hipolipemiantes (SANTOS et al., 2010; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). Há ainda uma grande preocupação com os efluentes provenientes de hospitais, que possuem uma carga elevada quando comparado a efluentes domésticos e podem conter fármacos com toxicidade elevada como, por exemplo, os antineoplásicos (LANGFORD; THOMAS, 2009; SANTOS et al., 2013).

Os fármacos entram nos compartimentos aquáticos após a utilização na medicina humana, veterinária e também a partir dos locais que são produzidos, pela indústria farmacêutica (FIGURA 1). A principal forma de contaminação é por meio da medicina humana (SANTOS et al., 2010), que pode ocorrer pelo descarte incorreto de medicamentos no lixo doméstico ou após a utilização do medicamento pelo ser humano. O descarte incorreto gera a presença de medicamentos no aterro sanitário contamina o solo e após processo de

lixiviação com as chuvas, contamina as águas subterrâneas, e pode chegar às águas superficiais (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007; GLASSMEYER et al., 2009; QUERO-PASTOR et al., 2014). Após a utilização pelos seres humanos, o medicamento é metabolizado e excretado na forma inalterada ou na forma de metabólitos pela urina ou pelas fezes. Essas excretas alcançam as estações de tratamento de esgoto podendo contaminar águas residuais e água potável (DAUGHTON, 2008; GLASSMEYER et al., 2009; SARAVANAN et al., 2011).

FIGURA 1 - FONTES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR MEDICAMENTOS



FONTE: Adaptado de EBELE et al., 2017.

A contaminação também pode ocorrer com a eliminação de medicamentos veterinários excretados na urina e nas fezes de animais (KEMPER, 2008). As fezes dos animais bem como lodos contaminados em estação de tratamento de esgoto, podem ser utilizadas como adubo em terras agrícolas, contaminando o solo e podendo sofrer escoamento

ou processo de lixiviação com a chuva, contaminando os corpos hídricos (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; TOPP et al., 2008; BOXALL et al., 2012). A utilização de medicamentos na aquacultura também se torna uma fonte de contaminação em virtude dos medicamentos e seus metabólitos lançados diretamente em águas superficiais (LALUMERA et al., 2004; LE; MUNEKAGE, 2004). Além das contaminações geradas durante a utilização dos medicamentos para uso humano e veterinário, os locais onde são produzidos os medicamentos, geram uma carga alta de resíduos que contribui para o processo de contaminação dos corpos hídricos (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007).

Em países em desenvolvimento como o Brasil, a problemática da contaminação se agrava, pois apresentam uma infraestrutura primitiva em relação ao saneamento básico e o contexto econômico e social contribuem para a contaminação ambiental contínua por fármacos. Nem toda a população tem acesso a tratamento de esgoto e nos locais onde está presente, o tratamento tem como objetivo geral a remoção de matéria orgânica e de patógenos para atender a legislações ambientais (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2018). Contudo, contaminantes emergentes como os medicamentos não são contemplados.

No Brasil e em outros países, as estações de tratamento de esgoto acabam desempenhando um papel fundamental na contaminação de águas superficiais pelos fármacos. Nesses locais, os fármacos estão presentes na matéria orgânica, e passam pelos processos de degradação microbiana (biodegradação) sob condições anaeróbias ou aeróbias, que são ineficientes para remover uma grande maioria de compostos (TRUDEAU et al., 2005; FERREIRA, 2014). A biodegradação envolve reações enzimáticas específicas que variam conforme as estruturas químicas dos compostos, tornando-a extremamente variável. São verificadas variações de biodegradação, até mesmo dentre compostos de uma mesma classe de medicamentos (ONESIOS; YU; BOUWER, 2009).

A ineficiência da retirada dos fármacos nas estações de tratamento de esgoto permite que alcancem as águas superficiais. Nesses locais, essas substâncias também podem sofrer processos de biodegradação (pelos microrganismos presentes no ambiente), além de fotodegradação e hidrólise (YAMAMOTO et al., 2009), sendo a fotodegradação uma das principais vias de degradação. A extensão da fotodegradação depende de fatores como a intensidade da irradiação solar, da profundidade da água, da latitude e a sazonalidade (BOREEN; ARNOLD; MCNEILL, 2003).

Os processos que ocorrem nas estações de tratamento de esgoto e em águas superficiais podem eliminar os fármacos, reduzir suas concentrações, transformá-los em metabólitos ou em alguns casos inalterá-los (XIA et al., 2005). No entanto, a quebra ou

remoção dos compostos parentais durante o período de vida não significa necessariamente a remoção de toxicidade. Produtos biotransformados em metabólitos podem ser ainda mais tóxicos do que os compostos originais (HAN; LEE, 2017).

Os fármacos, seja na forma inalterada ou de metabólitos, podem ter longo alcance nos corpos hídricos, dependendo das propriedades físico-químicas do composto e das características do ambiente receptor (EBELE; ABOU-ELWAFI ABDALLAH; HARRAD, 2017). Geralmente os fármacos possuem baixa volatilidade, são altamente polares com natureza hidrofílica; fazendo com que seu transporte no meio ambiente ocorra principalmente através da água e por dispersão na cadeia alimentar (CALIMAN; GAVRILESCU, 2009). Os fármacos também se acumulam ao sedimento por sorção e podem ser liberados novamente para o ambiente aquático (MARTÍN et al., 2010; AGUNBIADE; MOODLEY, 2016). Isso pode ter efeitos adversos sobre os organismos bentônicos (vivem no fundo dos corpos hídricos) que estão continuamente expostos a esses produtos químicos dentro dos sedimentos, água intersticial e água subjacente (GILROY et al., 2012).

Devido às inúmeras particularidades dos fármacos, várias tecnologias vêm sendo avaliadas quanto à eficiência para remover essas substâncias das estações de tratamento de esgoto. Existem estudos com adsorção em carvão ativado (ADAMS et al., 2002; NOWOTNY et al., 2007), filtração por membrana (YOON et al., 2006; VERLIEFDE et al., 2009), cloração (CHAMBERLAIN; ADAMS, 2006; DODD; HUANG, 2007), fotodegradação (CANONICA; MEUNIER; VON GUNTEN, 2008; CHALLIS et al., 2014), processos avançados de oxidação usando luz UV em combinação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ADÁN et al., 2006; ROSARIO-ORTIZ; WERT; SNYDER, 2010), processos de oxidação utilizando ozônio ou sua combinação com H_2O_2 e outros oxidantes (TERNES et al., 2003; IKEHATA; JODEIRI NAGHASHKAR; GAMAL EL-DIN, 2006; YARGEAU; LECLAIR, 2008).

Essas tecnologias possuem custo elevado e permanecem como um desafio futuro para o cenário nacional (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2018). Além disso, muitas dessas opções de tratamento têm limitações e desafios significativos. A cloração geralmente resulta em produtos de transformação que exibem toxicidade, como por exemplo, os compostos 1,4-benzoquinona e n-acetil-p-benzoquinona imina, produzidos a partir do acetaminofeno (BEDNER; MACCREHAN, 2006). O tratamento à base de ozônio pode conter brometo e pode formar o íon bromato, que tem potencial carcinogênico (MEUNIER; CANONICA; VON GUNTEN, 2006). Os processos oxidativos em geral são bastante eficientes, mas podem gerar a formação de subprodutos prejudiciais que devem ser avaliados e quando possível,

eliminados, através de etapas adicionais (CARLSON et al., 2015). O fato é que soluções definitivas e eficientes para remoção de fármacos da água, ainda não foram estabelecidas.

A ausência de tecnologias eficazes na retirada dos fármacos do meio ambiente gera a presença não intencional dessas substâncias na água, nos sedimentos e na biota, causando toxicidade para organismos não-alvo em diferentes níveis tróficos, incluindo algas, peixes, zooplâncton e outros invertebrados (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; DONNACHIE; JOHNSON; SUMPTER, 2016). Devido as suas características fisiológicas, os peixes são animais especialmente suscetíveis à absorção e efeitos dos fármacos. A absorção pode ocorrer através de superfícies dérmicas e branquiais, oralmente através da dieta e maternalmente pela transferência de contaminantes através da reserva lipídica de ovos (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010). A toxicidade pode variar de acordo com o organismo exposto, a duração da exposição, a concentração do contaminante e a fase de desenvolvimento em que o animal se encontra durante a exposição (WILKINSON et al., 2016).

Além da preocupação com os ecossistemas impactados, a detecção de fármacos na água potável gera preocupações em relação à saúde pública. Utilizando predições e modelos matemáticos, vários autores concluíram que os fármacos não oferecem um risco apreciável para aos seres humanos, por não serem expostos a quantidades capazes de causar algum efeito fisiológico (CHRISTENSEN, 1998; SCHWAB et al., 2005; CUNNINGHAM; BINKS; OLSON, 2009; WILKINSON et al., 2016). No entanto, as evidências até agora são insuficientes para concluir se os seres humanos são afetados biologicamente ou geneticamente em grau significativo. Dentre os complicadores para conclusões, está o fato de que ensaios de exposição direta em populações humanas são considerados antiéticos e há uma variedade de classes de medicamentos a que os seres humanos estão expostos (WILKINSON et al., 2016).

Em relação à legislação sobre a contaminação ambiental por medicamentos, países como os Estados Unidos e os pertencentes à União Europeia, exigem avaliações de risco ambientais para obtenção de autorização de comercialização para medicamentos de uso humano e veterinário (SANTOS et al., 2010). Além disso, são realizadas campanhas de conscientização quanto ao consumo racional de medicamentos e sobre os impactos ambientais, realizadas por empresas responsáveis pela gestão de resíduos de medicamentos e pelas indústrias. Já a Suécia, utiliza a avaliação do impacto ambiental dos fármacos como ferramenta de gestão, avaliando características do fármaco como persistência, bioacumulação e toxicidade. A aplicação dessa avaliação chega a gerar ações concretas como a substituição da utilização de fármacos que impactam de forma negativa o ambiente aquático. Um exemplo

é a substituição do medicamento Felodipina pela Amlodipina, devido a sua bioacumulação e o maior risco ambiental (OLIVEIRA et al., 2017).

No Brasil, algumas resoluções como a RDC N° 306/2004 (Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde) e resolução N° 358/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), abordam o descarte de medicamentos como um resíduo de saúde, que deve ter destinação específica, mas não trazem maiores informações. Há também a Política Nacional de Medicamentos que trata sobre o uso racional de medicamentos e a Política Nacional de Resíduos Sólidos, que demonstraram a necessidade na redução da geração dos resíduos. Diferente dos países citados a cima, no Brasil, as medidas de gestão dos resíduos de medicamentos ainda ocorrem de maneira isolada e não há ações conjuntas entre fabricantes, distribuidores de medicamentos e as companhias de coleta de resíduos, o que resulta na ausência de ações concretas e efetivas (OLIVEIRA et al., 2017).

2.1.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Dentre as diversas classes terapêuticas presentes no ambiente aquático, os AINEs destacam-se em relação à preocupação com o impacto ambiental. São frequentemente detectados nos corpos hídricos, devido a sua ampla utilização pela população, sendo o maior grupo de medicamentos sem prescrição médica vendido em todo o mundo (SOUSA et al., 2018). É ainda uma das classes terapêuticas mais consumidas em hospitais, sendo frequentemente detectada em águas provenientes de efluentes hospitalares (SANTOS et al., 2013; DAOUK et al., 2015). No Brasil, um levantamento recente feito sobre a ocorrência de medicamentos nos corpos hídricos, demonstrou que os AINEs mais frequentemente detectados são o diclofenaco, o acetaminofeno e o ibuprofeno (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2018).

Em seres humanos, os AINEs são utilizados para tratar sintomas de febre, dor e inflamação (PAROLINI; BINELLI; PROVINI, 2011). Atuam por inibição reversível ou irreversível de uma ou ambas as isoformas de enzimas ciclo-oxigenase, COX-1 e COX-2, envolvidas na síntese de diferentes prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010). O ácido araquidônico é mobilizado a partir da membrana celular pela enzima fosfolipase A2 (PLA₂), em seguida é convertido em prostaglandina H₂ (PGH₂), pela enzima prostaglandina H₂ sintase (PGHS) também conhecida como ciclooxigenase (COX), existindo em duas isoformas chamadas COX-1 (ptgs1) e COX-2 (ptgs2). A PGH₂ serve como substrato para enzimas envolvidas na síntese de outras

prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 , PGF_2), prostaciclina (PGI_2) e tromboxanos (TXA_2) (MORTHORST et al., 2013). A COX-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos e desempenha um papel importante na agregação plaquetária e na citoproteção gástrica. A COX-2, além de ser expressa constitutivamente no rim e no cérebro humano, tem a expressão induzida em diversos tecidos, durante processos inflamatórios (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; GÓMEZ-ABELLÁN; SEPULCRE, 2016).

A inibição das prostaglandinas pelos AINEs promove três efeitos principais, anti-inflamatório, analgésico e antipirético. O mecanismo de ação antipirética é relacionado com a inibição da produção de prostaglandinas pelo hipotálamo na presença de uma infecção. As prostaglandinas são estimuladas pela liberação de interleucina-1 pelos macrófagos a partir de endotoxinas bacterianas presentes no organismo (ARONOFF; NEILSON, 2001). O efeito analgésico consiste no fato de que menor geração de prostaglandinas significa menor sensibilização de terminais nervosos nociceptivos a mediadores inflamatórios, que ocasionam dor quando ocorrem processos inflamatórios. A ação anti-inflamatória provém do fato de que os AINEs reduzem os componentes da resposta inflamatória e imune, onde os produtos da ação da COX-2 contribuem para a vasodilatação (mediada pelas prostaglandinas PGE_2 e PGI_2) que resulta indiretamente em edema e dor (HINZ et al., 2007).

Em geral, os sistemas biológicos pelos quais os medicamentos exercem seus efeitos em seres humanos são conservados evolucionariamente no reino animal, resultando em efeitos biológicos em espécies não alvo, como os peixes (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010). Vários estudos vêm demonstrando a presença das duas isoformas da COX, presentes em humanos, também em diferentes espécies de peixes, como *Danio rerio* (JI et al., 2013; MORTHORST et al., 2013; XIA; ZHENG; ZHOU, 2017), *Pimephales promelas* (PATEL et al., 2016), *Oryzias latipes* (FLIPPIN; HUGGETT; FORAN, 2007), *Oncorhynchus mykiss* (MEHINTO; HILL; TYLER, 2010; CUKLEV et al., 2011), *Fundulus heteroclitus* (CHOE et al., 2006). Além da presença da COX, peixes expostos a AINEs também apresentam diminuição de prostaglandinas (BHANDARI; VENABLES, 2011; MORTHORST et al., 2013; PATEL et al., 2016; DAVID et al., 2017).

As prostaglandinas desempenham uma variedade de papéis fisiológicos, vitais para o pleno funcionamento do organismo de seres vivos (JEFFRIES et al., 2015). Em mamíferos, além do envolvimento em processos como inflamação e dor, atuam na regulação do fluxo sanguíneo renal, em processos de coagulação, na proteção da mucosa gástrica, na termorregulação e no controle da ovulação (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010; FUJIMORI et al., 2011). As funções biológicas das

prostaglandinas em peixes não são tão bem definidas como em mamíferos (PATEL et al., 2016), mas é conhecido seu envolvimento na osmorregulação (CHOE et al., 2006), na imunidade (GÓMEZ-ABELLÁN; SEPULCRE, 2016), no sistema hematológico (YEH; WANG, 2006) e na reprodução (HAYASHI et al., 2008).

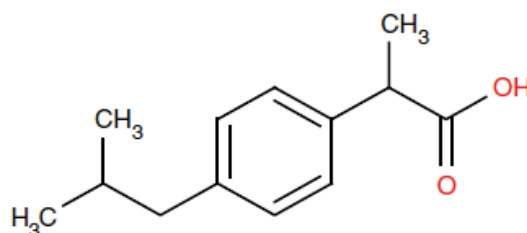
Em relação à reprodução, o papel das prostaglandinas é mais estabelecido e demonstra ser essencial em peixes. As prostaglandinas estimulam a maturação de oócitos, a ovulação (LISTER; VAN DER KRAAK, 2008), regulam a esteiroidogênese gonadal (VAN DER KRAAK; CHANG, 1990; WADE; VAN DER KRAAK, 1993) e estão envolvidas na indução do comportamento sexual masculino e feminino em peixes (SORENSEN; GOETZ, 1993).

A diminuição das prostaglandinas pode causar uma série de impactos sobre a fisiologia e reprodução, gerando toxicidade a espécies não alvo. Pouco ainda é conhecido quanto aos efeitos potenciais de alterações do metabolismo de eicosanoides em peixes expostos aos AINEs (BHANDARI; VENABLES, 2011), contudo diversos estudos vêm demonstrando alterações em sistemas biológicos e consequente toxicidade. Dentre os AINEs, os fármacos que tem sido mais estudados e revelado maior toxicidade para os peixes são o diclofenaco, o naproxeno, o cetoprofeno e o ibuprofeno (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010; SANTOS et al., 2010; WILKINSON et al., 2016; SOUSA et al., 2018).

2.1.1.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico) (FIGURA 2), é um fármaco pertencente à classe dos AINEs e amplamente utilizado como analgésico, antipirético e anti-inflamatório (DONNACHIE; JOHNSON; SUMPTER, 2016). Atua como inibidor não seletivo das COX 1 e 2, impedindo a formação de mediadores pró-inflamatórios pela cascata do ácido araquidônico (GRAVEL et al., 2009). É um medicamento livre de prescrição, produzido em grandes quantidades, disponível em várias formulações por todo o mundo e um dos principais medicamentos na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (HAN et al., 2010; FERREIRA, 2014).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO IBUPROFENO



FONTE: FERRANDO-CLIMENT et al., 2012.

Após a metabolização humana, principalmente hepática, o ibuprofeno é excretado em um grau significativo (70-80% de uma dose terapêutica) como composto original ou sob a forma de metabólitos (POUNDS et al., 2008; PAROLINI; BINELLI; PROVINI, 2011). Os principais metabólitos são o hidroxi-ibuprofeno (IBU-OH) e o carboxi-ibuprofeno (IBU-CBX), que são inativos. Nas estações de tratamento de esgoto e no ambiente natural, o composto original sofre metabolização por microrganismos, gerando os mesmos metabólitos (ZWIENER et al., 2002; COLLADO et al., 2012; FERRANDO-CLIMENT et al., 2012).

Em estações de tratamento de esgoto, foi observado que a remoção do ibuprofeno e de seus metabólitos pode chegar a 95% (GÓMEZ et al., 2007; MONTEIRO; BOXALL, 2010). Contudo, dependendo dos processos utilizados, a eficiência de remoção pode variar amplamente. A remoção se torna mais eficiente em condições anóxicas, pH ácido e alta radiação solar. A degradação fotolítica depende das condições eutróficas, grau de material particulado e ainda da profundidade do curso de água (FERREIRA, 2014). É preciso considerar também que países em desenvolvimento como o Brasil, não oferecem tratamento de esgoto para a totalidade da população (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2018), o que resulta na contaminação direta dos corpos hídricos por fármacos.

Devido à ampla utilização pela população, às taxas variáveis de remoção das estações de tratamento de esgoto e a ausência de tratamento em alguns locais, o ibuprofeno tem sido detectado em águas superficiais de diversos países incluindo Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Alemanha, Austrália, China, Espanha, Suíça, Nigéria, Índia, Romênia, Turquia e Coreia do Sul. Nesses locais, as concentrações detectadas variaram de 0,001 a 117 µg/L (EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). No Brasil, o ibuprofeno foi detectado na faixa de concentração de 4,66-6,55 µg/L em efluentes de estações de tratamento de águas residuais no Rio de Janeiro (FERREIRA, 2014); no Rio Doce em Minas Gerais na concentração de 0,002 µg/L (RODRIGUES et al., 2014); em análises de sedimento

na Baía de Todos os Santos na Bahia (0,01 µg/g) (BERETTA et al., 2014); e na água do mar da Baía de Santos em São Paulo (0.3 – 1.8 µg/L) (PEREIRA et al., 2016a).

Em relação à detecção do fármaco no Paraná, foi realizado recentemente um estudo de monitoramento no rio Iguaçu, o principal rio do Estado, para avaliar a presença de contaminantes emergentes. Amostras de água foram coletadas em cinco campanhas amostrais, em dez pontos de coletas em três afluentes do rio Iguaçu, os rios Belém, Atuba e Palmital. Os resultados demonstraram que o ibuprofeno foi o segundo anti-inflamatório quantificado em maiores concentrações, variando entre 0,06 - 9,87 µg/L e presente em 53 % das amostras analisadas (MIZUKAWA, 2016).

Devido à frequência de detecção nos corpos hídricos, diversos estudos vêm demonstrando que o ibuprofeno pode causar efeitos tóxicos em diferentes animais aquáticos (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010). Uma lista de poluentes prioritários tem sido desenvolvida pela União Europeia e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Esta lista identifica uma grande variedade de produtos químicos presentes em águas residuais que podem representar uma ameaça para os corpos hídricos. Baseado em inúmeros estudos em peixes, crustáceos, invertebrados, plantas, dentre outros, o ibuprofeno vem sendo avaliado como candidato a inclusão nessa lista (EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017).

Estresse oxidativo foi observado em exposições agudas ao fármaco em carpa comum (*Cyprinus carpio*) na concentração de 17,6 mg/L (ISLAS-FLORES et al., 2014), em bivalves (*Dreissena polymorpha*) expostos a 0,2 - 8 µg/L (PAROLINI; BINELLI; PROVINI, 2011) e em microcrustáceos (*Daphnia magna*) expostos a 2,9 mg/L (GÓMEZ-OLIVÁN et al., 2014). Além do estresse oxidativo, em *Dreissena polymorpha* e *Daphnia magna* foi observado dano ao DNA, bem como em *Danio rerio* exposto à concentração de 66,4 ng/µL durante 28 dias. O ibuprofeno também causou alterações hematológicas em carpa maior indiana *Cirrhinus mrigala* (SARAVANAN et al., 2012) expostas a 14,2 mg /L ao longo de 35 dias, imunossupressão em bivalve *Ruditapes philippinarum* exposto a 100 e 1000 µg/L por 3, 5 e 7 dias (MILAN et al., 2013) e diminuição da capacidade osmorregulatória em peixe *Menidia beryllina* expostos a 1,15 mg/L de ibuprofeno (JEFFRIES et al., 2015). Estudos com embriões de *Danio rerio* revelaram que o ibuprofeno interfere no desenvolvimento, crescimento larval e sobrevivência (DAVID; PANCHARATNA, 2009), além de afetar a locomotividade embrionária e causar neurotoxicidade (XIA; ZHENG; ZHOU, 2017).

O ibuprofeno também demonstrou causar toxicidade para a reprodução de peixes. Flippin et al., (2007) verificaram alterações no padrão de reprodução da espécie *Oryzias*

latipes exposta a ibuprofeno (1–100 µg/L) por seis semanas, observando aumento no número de ovos por evento reprodutivo e diminuição no número de desovas por semana. Han et al., (2010) também utilizando *Oryzias latipes* como modelo experimental, demonstrou *in vivo* que o fármaco (0.01- 1.000 µg/L) causou indução de vitelogenina em peixes machos (proteína presente em fêmeas, com função de nutrição de embrião), menor número de ninhadas por par, e mais ovos por ninhada em fêmeas, além de atraso na eclosão de ovos. O microcrustáceo *Daphnia magna* exposto por 10 dias a concentrações de 0, 20, 40 e 80 mg/L, produziu menos descendentes nos indivíduos expostos as concentrações mais elevadas, bem como um atraso na idade para a primeira reprodução em todas as concentrações avaliadas (HAYASHI et al., 2008).

Embora a literatura sobre o ibuprofeno seja ampla, algumas lacunas são verificadas. Pouca informação é gerada em relação aos efeitos sistêmicos e reprodutivos de fármacos em peixes neotropicais nativos da América do Sul, a maioria dos estudos concentra-se em espécies que são modelos de estudo bem estabelecidos, mas provenientes de outras regiões do mundo, como por exemplo, o *Danio rerio*. Contudo, diferentes espécies podem responder aos contaminantes de maneira distinta (MILAN et al., 2013), tornando importante a produção de dados para peixes neotropicais. Alguns dos estudos disponíveis utilizam concentrações na faixa de mg/L (SARAVANAN et al., 2012; GÓMEZ-OLIVÁN et al., 2014; ISLAS-FLORES et al., 2014; JEFFRIES et al., 2015), que não são comumente encontradas no ambiente aquático e por isso não trazem resultados fidedignos em relação ao impacto ambiental.

Considerando toda a problemática atual dos medicamentos no meio ambiente e as lacunas presentes na literatura em relação ao ibuprofeno, o presente trabalho propôs avaliar os efeitos desse contaminante em peixe neotropical *Rhamdia quelen*, em concentrações ambientalmente relevantes. Os efeitos do fármaco foram avaliados em diferentes tecidos e sistemas biológicos, procurando revelar possíveis efeitos tóxicos sistêmicos bem como reprodutivos.

2.2 BIOMARCADORES

A contaminação ambiental por diversos poluentes vem crescendo ao longo dos anos como consequência das atividades antropogênicas. Os fármacos surgem como contaminantes emergentes, fazendo parte dessa ampla gama de poluentes que causam impacto em ambientes aquáticos e terrestres. Para identificar, avaliar e gerenciar os riscos que os contaminantes podem causar pode-se lançar mão da utilização de biomarcadores. Os biomarcadores são

definidos como respostas biológicas que ocorrem no organismo exposto ao contaminante e que podem ser mensuradas (HOOK et al., 2014), como alterações metabólicas, moleculares, bioquímicas e teciduais, além de efeitos sobre o comportamento, reprodução, crescimento e sobrevivência (SMIT et al., 2009).

Nesse trabalho foram utilizados biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade, hematológicos, osmorregulatórios e histopatológicos em diferentes órgãos e sistemas. Foi ainda avaliado o possível efeito desregulador endócrino do poluente, utilizando biomarcadores relacionados ao eixo reprodutivo. Aliando diversos biomarcadores e investigando diferentes sistemas, é possível ter uma visão global dos efeitos do poluente sobre o modelo experimental escolhido.

2.2.1 Biomarcadores bioquímicos

A exposição de organismos a contaminantes ambientais provoca mudanças significativas em processos enzimáticos, de forma que estes podem ser utilizados como biomarcadores de exposição a contaminantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os biomarcadores bioquímicos avaliam as alterações causadas por poluentes a nível subcelular em processos que envolvem enzimas, como a biotransformação e os sistemas antioxidantes, que defendem o organismo do estresse oxidativo (KERAMBRUN et al., 2011).

A biotransformação de xenobióticos envolve sistemas enzimáticos nomeados de fase I e fase II, através das quais os compostos tornam-se solúveis em água e, portanto, podem ser mais facilmente excretados. A fase I inclui principalmente reações de oxidação, redução, hidrólise e acetilação. As principais enzimas envolvidas nessa fase são as do citocromo P450 (RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015). Dentre elas, a CYP1A, desempenha um papel fundamental na biotransformação de uma grande variedade de xenobióticos e, tem sido amplamente utilizada como biomarcador da poluição ambiental em ecossistemas aquáticos. A atividade enzimática de CYP1A é quantificada como etoxisorufina-O-deetilase (EROD) e sua indução ocorre após a ativação do ligante ao receptor de aril hidrocarboneto (AhR). Este receptor é geralmente ativado por compostos policíclicos e aromáticos, incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos, dioxinas e bifenilas policloradas (QUESADA-GARCÍA et al., 2013). No entanto, há evidências crescentes de que a ativação de AhR também é desencadeada por outros compostos, incluindo alguns medicamentos e agrotóxicos (CASADO et al., 2006; FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2011).

As reações de fase II são caracterizadas pela adição de compostos polares endógenos (por exemplo, glutathione ou ácido glicurônico) a metabólitos formados durante as reações de fase I ou diretamente ao xenobiótico original. Enzimas como uridina-5-difosfato glucuroniltransferase (UDPGT) e glutathione S-transferase (GST) têm um papel fundamental nessas reações de conjugação (REYNAUD; RAVETON; RAVANEL, 2008; RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015). A toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada por indução da GST, por isso a análise de sua atividade é utilizada em avaliações de risco ambiental de contaminantes (KERAMBRUN et al., 2011).

A biotransformação de compostos pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser contidas por enzimas antioxidantes (RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015). Mudanças nos níveis de enzimas antioxidantes têm sido utilizadas como biomarcadores do estado biológico do peixe ou como indicador da qualidade do meio exposto à contaminação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BURGOS-ACEVES et al., 2018).

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre as EROs e o sistema de defesa antioxidante (SLANINOVA et al., 2009). Os produtos de redução do oxigênio molecular (O_2) são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}). A geração dessas espécies reativas pode levar a inativação enzimática, peroxidação lipídica, dano ao DNA e, conseqüentemente morte celular (WINSTON; GIULIOZ, 1991; ZHANG et al., 2004). Os xenobióticos podem gerar estresse oxidativo por diferentes mecanismos bioquímicos como, por exemplo, atuar comprometendo a cadeia de transporte de elétrons em membranas e gerar acúmulo de produtos de reação intermediários, causar a inativação de enzimas antioxidantes e a diminuição de moléculas que eliminam radicais livres (SLANINOVA et al., 2009).

Para neutralizar os efeitos dos radicais livres, os seres vivos contam com inúmeros mecanismos de defesa antioxidante, incluindo sistemas enzimáticos que atuam removendo as EROs e evitando seus danos. As enzimas mais importantes para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Há ainda mecanismos não enzimáticos, onde atuam moléculas antioxidantes como a glutathione (GSH) (DI GIULIO; MEYER, 2008). Essas enzimas antioxidantes são encontradas praticamente em todos os tecidos de vertebrados, mas em geral, apresentam alta atividade no fígado, um órgão importante para a transformação enzimática das EROs (ZHANG et al., 2004).

A enzima SOD catalisa a conversão do ânion reativo superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na sequência, o H_2O_2 é eliminado pelas enzimas CAT e GPx. A CAT metaboliza o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água. A GPx catalisa o metabolismo de H_2O_2 em água, concomitante a uma oxidação de GSH reduzida a sua forma oxidada (GSSG) e desempenha um papel especialmente importante na proteção de membranas de danos causados pela lipoperoxidação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Completando os mecanismos de defesa, há ainda a molécula antioxidante glutatona reduzida (GSH), que ao combinar o seu grupamento tiol com as EROs, doa um átomo de hidrogênio, o que acelera a eliminação de radicais livres (HUSSAIN; SLIKKER; ALI, 1996).

Caso o sistema antioxidante não consiga conter a geração das EROs, surgem danos como a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, que também podem ser utilizadas como biomarcadores. A peroxidação lipídica é um conjunto de reações em cadeia, que ocorre em ácidos graxos poli-insaturados, muito sensíveis a reações oxidativas, em virtude de suas duplas ligações. O resultado dessas reações é a formação de produtos tóxicos e mutagênicos, que tornam as membranas rígidas, sem permeabilidade e integridade (VALAVANIDIS et al., 2006). Já a carbonilação de proteínas é o processo de oxidação de proteínas, onde ocorrem modificações em cadeias de aminoácidos e clivagem de peptídeos mediada por EROs, resultando na formação de derivados de proteínas carbonil (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Proteínas carboniladas podem perder a função ou ainda sofrer degradação pelo proteassoma, que são complexos proteicos que degradam as proteínas desnecessárias ou danificadas (WONG et al., 2010).

Para a avaliação das funções neurais, particularmente a neurotransmissão, pode ser avaliada a atividade da enzima da acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima está presente no cérebro e em tecidos musculares de teleósteos e está envolvida na degradação da acetilcolina nas terminações nervosas, evitando disparos nervosos contínuos, o que é vital para o funcionamento normal dos sistemas sensoriais e neuromusculares. Contaminantes como agrotóxicos do grupo dos organofosforados e dos carbamatos são conhecidos por inibir a atividade da AChE em peixes teleósteos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Contudo, a análise dessa enzima vem sendo utilizada também no estudo de contaminantes emergentes como os fármacos, para avaliar os efeitos dessas substâncias sobre o sistema nervoso central de animais aquáticos (NUNES; CARVALHO; GUILHERMINO, 2004; SOLÉ et al., 2010).

2.2.2 Biomarcadores de genotoxicidade

A exposição de um organismo a produtos químicos genotóxicos pode causar alterações estruturais no material genético e pode resultar em mutações com efeitos hereditários a longo prazo em populações de peixes (HUSSAIN et al., 2017). O ensaio cometa e o teste de micronúcleo são frequentemente utilizados para avaliar a mutagenicidade e carcinogenicidade de produtos químicos, incluindo medicamentos (KUMAR et al., 2015). As técnicas geram informações complementares e podem ser usadas em combinação, para rastrear efeitos genotóxicos de poluentes ambientais (ZAPATA et al., 2016).

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única ou electroforese em microgel, permite detectar quebras nas cadeias de DNA, que podem ser visualizadas pelo aumento da migração de segmentos de DNA livres, resultando em imagens semelhantes a cometas, justificando o nome do ensaio (KANNAAR; HOEIJMAKERS; VAN GENT, 1998). A técnica permite detectar rupturas de cadeia duplas e cadeia simples, e com base no pH do tampão empregado, o ensaio pode ser ácido, alcalino e neutro. Contudo o método alcalino desenvolvido por Singh et al. (1988), tornou-se o mais utilizado e recomendado devido ao seu amplo espectro de detecção de danos ao DNA (ARALDI et al., 2015).

O ensaio cometa tem sido utilizado em diversos estudos, incluindo os de biomonitorização e de eco-genotoxicidade. Pode ser realizado com qualquer população de células eucarióticas *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*. Permite analisar a genotoxicidade em tecidos específicos, que estão em contato direto com a substância testada ou em tecidos onde a substância foi absorvida, metabolizada e excretada (ARALDI et al., 2015).

O teste do micronúcleo é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, amplamente utilizado na avaliação de danos citogenéticos em populações expostas a agentes genotóxicos (TERRADAS et al., 2010). Esta técnica baseia-se na quantificação de cromossomos inteiros ou cromossomos fragmentados não incorporados no núcleo principal durante o processo de mitose. Esses fragmentos são envolvidos por membrana nuclear e podem ser visualizados no citoplasma (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Os micronúcleos podem ser formados a partir de dois mecanismos: rupturas cromossômicas (clastogênese) ou interrupção do aparelho mitótico (aneugênese). Uma frequência elevada de micronúcleos indica danos cromossômicos (SAMANTA; DEY, 2012).

Além do micronúcleo, podem ser investigadas outras alterações morfológicas nucleares, que também são consideradas indicadores de dano genotóxico. Exemplos de

alterações são células binucleadas e os núcleos fragmentados (HUSSAIN et al., 2017), e tem sido detectada em eritrócitos de peixes como consequência da exposição a contaminantes ambientais que tenham efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. A avaliação das alterações morfológicas nucleares é complementar ao teste do micronúcleo e tem sido extensivamente aplicada em avaliações de genotoxicidade em peixes, devido a sua comprovada adequação (MURANLI; GÜNER, 2011).

2.2.3 Biomarcadores osmorregulatórios

Para manter a homeostase osmótica e iônica interna, os teleósteos possuem mecanismos complexos e sofisticados de osmorregulação. Esses mecanismos permitem o funcionamento normal dos processos celulares e fisiológicos, garantindo a sobrevivência dos animais (HWANG; LEE, 2007; TSENG; HWANG, 2008).

Em peixes de água doce, as brânquias e os rins representam os principais órgãos responsáveis pela osmorregulação. As brânquias são o principal local para trocas gasosas, transporte de íons, regulação ácido-base e a excreção de resíduos nitrogenados (MARSHALL; GROSELL, 2006; SILVA; MARTINEZ, 2014). Os rins equilibram a absorção osmótica da água com a filtração glomerular e a formação de urina, e ainda contribuem para minimizar a perda de sais realizando uma reabsorção tubular significativa de íons (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Em peixes de água doce, a urina produzida é hipotônica para minimizar a perda de íons importantes e o produto de excreção é rico em íons divalentes como cálcio, magnésio e sulfato. As brânquias e os rins equilibram a concentração plasmática de íons como potássio, magnésio e cálcio para manter a pressão osmótica (MARSHALL; GROSELL, 2006).

Para que ocorra o equilíbrio ácido base e osmótico, os órgãos osmorregulatórios utilizam trocadores de íons e enzimas como a anidrase carbônica e as ATPases (SILVA; MARTINEZ, 2014). Trocadores de íons como Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, permitem a absorção de íons (Na^+ ou Cl^-) do meio externo para o interno, acoplada à transferência para o meio externo de íons H^+ ou HCO_3^- . Em peixes de água doce, a absorção de Na^+ ou Cl^- em troca de H^+ ou HCO_3^- permite que o animal faça ajustes de ácido-base, e mantenha homeostase osmoregulatória extraindo NaCl do ambiente diluído (CLAIBORNE; EDWARDS; MORRISON-SHETLAR, 2002). Os íons sódio e cloreto plasmáticos são fatores chave para manter a pressão osmótica e precisam ser continuamente absorvidos (SAGLAM; ATLI; CANLI, 2013).

A anidrase carbônica é uma metaloenzima presente em bactérias, vegetais e animais, que catalisa a hidratação reversível de CO_2 , gerado durante processos metabólicos celulares, para produzir H^+ e HCO_3^- (LIONETTO et al., 2012). Desempenha um papel fundamental em processos fisiológicos como trocas gasosas, equilíbrio ácido-base e depuração de resíduos do metabolismo nitrogenado (LIONETTO et al., 2000). As ATPases são enzimas responsáveis pelo transporte de íons através das membranas e, portanto, ajudam na regulação do volume celular, pressão osmótica e permeabilidade da membrana (ATLI; CANLI, 2011; SAGLAM; ATLI; CANLI, 2013). Dentre as ATPases, a Na^+K^+ ATPase é diretamente relacionada às trocas de Na^+ e Cl^- , tendo funções importantes em tecidos osmorregulatórios como brânquias e rim (MONSERRAT et al., 2007).

Com o pleno funcionamento dos transportadores e enzimas os peixes permanecem em condições fisiológicas normais e garantem equilíbrio iônico e osmótico. No entanto, ao entrar em contato com poluentes no meio aquático, órgãos osmorregulatórios importantes como a brânquia e o rim podem ser impactados. (MARSHALL; GROSELL, 2006; MELA et al., 2013b; SAGLAM; ATLI; CANLI, 2013). Nesses tecidos, os poluentes podem causar efeitos na atividade catalítica da anidrase carbônica, da Na^+K^+ ATPase ou ainda em transportadores de íons, levando a distúrbios na homeostase em peixes. Portanto, avaliações da atividade de enzimas bem como a quantificação de íons envolvidos no equilíbrio osmótico e ácido base podem ser utilizados como biomarcadores e fornecer informações importantes sobre o efeito fisiológico de contaminantes no meio aquático (MONSERRAT et al., 2007; LIONETTO et al., 2012; PRODOCIMO et al., 2015).

2.2.4 Biomarcadores hematológicos

Vários parâmetros hematológicos podem ser utilizados como biomarcadores em peixes, pois fornecem informações quanto à fisiologia geral e estado de saúde do organismo sob investigação (BEYER et al., 1997). Podem ser avaliadas alterações causadas pelo contaminante na série vermelha, na série branca, na quantificação de enzimas e em parâmetros fisiológicos como glicose e lipídeos. A avaliação da série branca permite avaliar o sistema imunológico dos peixes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Como em mamíferos, os peixes apresentam imunidade inata e a adquirida. Em relação à imunidade inata, a fagocitose é um passo essencial e caracteriza-se por ingestão celular e digestão de partículas. É essencialmente uma reação defensiva contra a infecção e a invasão do organismo, já que remove o patógeno (ESTEBAN et al., 2015). Em mamíferos e

em outros vertebrados, incluindo peixes, as células que realizem a fagocitose incluem os neutrófilos e monócitos (NEUMANN et al., 2001; CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008; URIBE et al., 2011). Os trombócitos também são importantes mediadores da imunidade inata e apresentam atividade fagocítica (FERDOUS; SCOTT, 2015).

A resposta imune adquirida ocorre através de mecanismos que envolvem uma rede complexa de células, proteínas, genes e mensagens bioquímicas especializadas que fornecem os meios necessários para que o organismo responda aos antígenos, anticorpos e células efectoras. Dentre as células envolvidas, os peixes apresentam os linfócitos T, que geram reações celulares citotóxicas, e também os linfócitos B que produzem anticorpos, e ambos atuam para eliminar células alteradas (FISCHER et al., 2006; URIBE et al., 2011). Além dos linfócitos, os trombócitos também estão envolvidos na imunidade adquirida atuando como células apresentadoras de antígenos (FERDOUS; SCOTT, 2015; NAGASAWA; SOMAMOTO; NAKAO, 2015).

Devido ao papel fisiológico fundamental do sistema imunológico, qualquer tipo de comprometimento da resposta pode ser interpretado como um sinal importante na avaliação de impacto de um contaminante. É possível que os efeitos imunossupressores de poluentes sirvam como fatores causais na origem de doenças de peixes com etiologia multifatorial, como por exemplo, doenças da pele como papilomas e úlceras (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). De fato, uma imunossupressão predispõe os peixes a doenças porque altera sua capacidade de combater agentes patogênicos. Por isso a avaliação da série branca, pode ser usada como alerta precoce para o potencial dano de produtos químicos ambientais (MAGNADÓTI, 2006; KÖLLNER et al., 2008).

2.2.5 Biomarcadores de desregulação endócrina

O ecossistema aquático é o último destino para a maioria dos contaminantes antropogênicos, sendo um dos ambientes mais expostos a poluentes. A presença desses compostos pode causar toxicidade à vida selvagem por diferentes mecanismos, destacando-se dentre eles, a desregulação endócrina (HACHFI et al., 2012; EBELE; ABOU-ELWAFI; ABDALLAH; HARRAD, 2017). Desreguladores endócrinos são definidos como moléculas exógenas que podem afetar a síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação, ação e catabolismo de hormônios naturais do organismo. Em doses extremamente pequenas, podem mimetizar, bloquear ou interferir na atividade hormonal normal, trazendo prejuízo para a

saúde do organismo exposto, bem como para seus descendentes ou subpopulações (KAVLOCK et al., 1996; SCHETTLER et al., 2000; BERGMAN et al., 2012).

Modelos matemáticos e avaliações experimentais confirmam que desreguladores endócrinos podem causar declínio das populações de peixes por fatores como feminilização e intersexualidade em peixes machos, e alterações na oogênese (diferenciação do óvulo) em fêmeas (GURNEY, 2006; KIDD et al., 2007). Aliado a isso, tem-se o fato de que os animais aquáticos estão expostos a misturas complexas de contaminantes, com a possibilidade de exposição a vários desreguladores endócrinos em conjunto, potencializando seus efeitos (KIYAMA; WADA-KIYAMA, 2015).

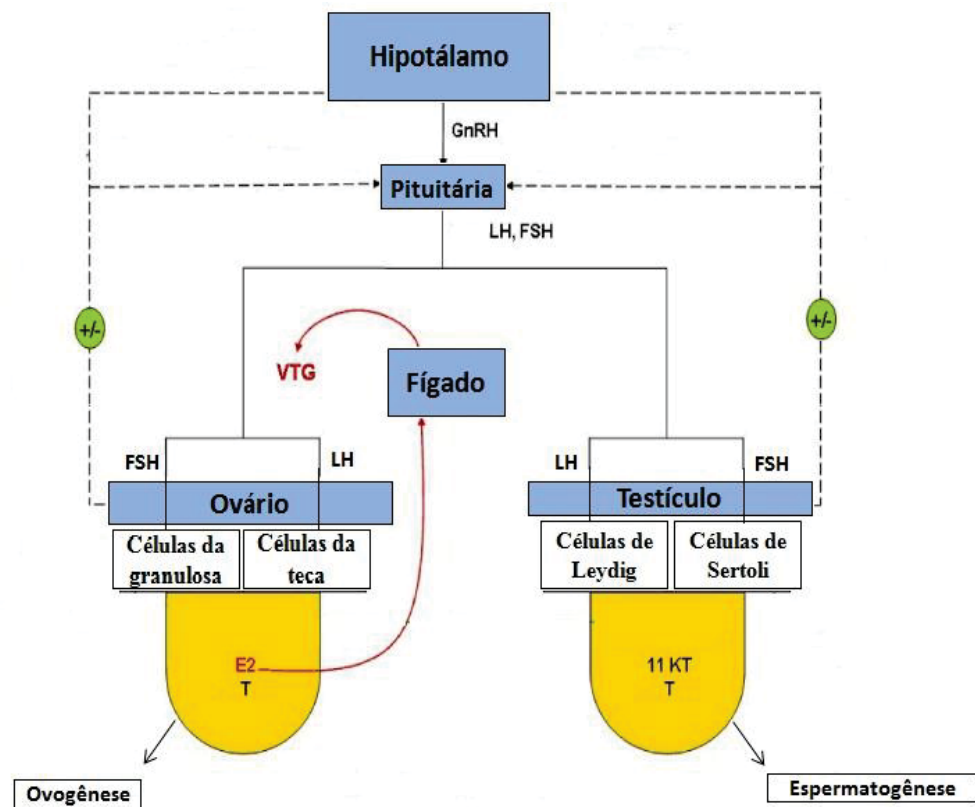
Diversas substâncias presentes no meio aquático tem conhecido efeito como desreguladores endócrinos, como por exemplo, plastificantes como ftalatos e bisfenol A, agrotóxicos, metais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilas policloradas (BARS et al., 2012; FRISCHE et al., 2013). Mais recentemente, os medicamentos presentes nos corpos hídricos também tem demonstrado ter potencial desregulador endócrino. Dentre as classes com efeitos já confirmados, estão contraceptivos orais, glicorticóides, hormônios do crescimento veterinários e os AINEs (EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017).

Vários parâmetros relacionados à reprodução dos peixes podem ser utilizados para avaliar os efeitos de desreguladores endócrinos (YAMAMOTO et al., 2017). O eixo hipotálamo-pituitária-gônada-fígado (HPGF) (FIGURA 3), é um dos principais alvos de desreguladores endócrinos, por estar envolvido com o controle da reprodução e com a regulação hormonal em peixes teleósteos. A avaliação do eixo HPGF revela vários modos potenciais de interação de desreguladores endócrinos, que variam de interferência com a síntese e secreção hormonal a ligação com receptores hormonais ou alteração da disponibilidade de hormônios endógenos. Assim, a maioria dos biomarcadores para avaliação da desregulação endócrina está relacionada a esse eixo e a sua função (HACHFI et al., 2012; BRETON et al., 2015).

O eixo HPGF controla a síntese de hormônios em machos e fêmeas, além de eventos como a ovulação e a espermatogênese. Para ambos os sexos, sinais provindos do cérebro controlam a secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), responsável por estimular a pituitária a liberar as gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Em fêmeas, o FSH se liga aos seus receptores nas células da granulosa nos ovários, onde estimula a maturação folicular e a conversão de andrógenos a estrogénos pela aromatização. O hormônio 17β -estradiol formado a partir da

influência do FSH, atua estimulando o fígado, para produzir VTG, proteína que atua na nutrição do embrião. Já o LH se liga ao seu receptor nas células da teca e induz a produção de andrógenos e a ovulação. Em machos, o FSH atua em seus receptores localizados nas células de Sertoli, onde desencadeia proliferação dessas células e a espermatogênese; enquanto o LH atua nas células de Leydig, estimulando a síntese de andrógenos. Os andrógenos produzidos são testosterona e predominantemente 11-Ketotestosterona (HACHFI et al., 2012).

FIGURA 3 - EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADA-FÍGADO (HPGF) EM PEIXES TELEÓSTEOS



FONTE: Adaptado de HACHFI et al., 2012.

Dentro do eixo HPGF, a VTG é um parâmetro amplamente utilizado para detecção de exposição à desreguladores endócrinos (SWANSON; DICKEY; CAMPBELL, 2003). A VTG é uma fosfolipoglicoproteína, precursora da gema do ovo de peixes teleósteos. Os ovos possuem uma massa de gema substancial que é uma fonte rica em proteínas e lipídios, para desenvolvimento embrionário e crescimento larval, e uma grande porção da massa de gema é derivada da VTG (HIRAMATSU et al., 2015). Sua produção ocorre no fígado em resposta à ligação de estrogênio em seus receptores presentes nos hepatócitos (NAGLER et al., 2010; DANG, 2014). Após a produção, a VTG é transportada através do fluxo sanguíneo para os ovários e acumulada seletivamente para o crescimento dos oócitos (MIZUTA et al., 2013).

Devido ao seu papel na gema dos ovos, espera-se que a VTG esteja presente em concentrações elevadas apenas em fêmeas maduras durante o período reprodutivo (YAMAMOTO et al., 2017). Seus níveis são praticamente indetectáveis no plasma de fêmeas imaturas e de machos, porque não possuem estrogênio circulante suficiente para estimular a síntese dessa proteína. Contudo, os machos apresentam o gene da VTG e sua expressão pode ser induzida quando são expostos a estrogênio ou a contaminantes ambientais estrogênicos, permitindo que o fígado dos machos também sintetize e secrete VTG (HUTCHINSON et al., 2005; ORLANDO; GUILLETTE, 2007; DANG, 2014). Sua avaliação em peixes machos é considerada um biomarcador bem documentado para investigar os efeitos de substâncias estrogênicas, validado como um indicador a nível populacional de efeitos de desreguladores endócrinos sobre a reprodução (SUMPTER; JOBLING, 1995; SANTOS et al., 2010; HOOK et al., 2014).

Outro alvo muito importante dos desreguladores endócrinos é o complexo enzimático formado pelo citocromo P450 aromatase (CYP19), uma vez que apresenta papel fundamental na biossíntese de estrógenos e na regulação do eixo HPGF. A aromatase é a única enzima que permite a conversão de andrógenos C19, como testosterona e androstenediona, em estrogénos C18, como estradiol e estrona (DIOTEL et al., 2010; COUMAILLEAU et al., 2015). É codificada por dois genes em teleósteos, o gene *cyp19a1a* principalmente expresso nas gônadas e referido como aromatase gonadal e o gene *cyp19a1b*, principalmente expressas no cérebro e, conhecido como aromatase cerebral (CHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

Nas gônadas, a aromatase (*cyp19a1a*) determina o equilíbrio entre andrógenos e estrógenos e apresenta um papel chave na diferenciação sexual de peixes durante o desenvolvimento e também na vida adulta. Durante o desenvolvimento inicial das gônadas, o bloqueio da aromatase e a consequente diminuição do estrogênio resultam na diferenciação do tecido em testículos, enquanto a presença de estrogênio devido ao aumento da expressão da aromatase causará o desenvolvimento dos ovários (GONÇALVES et al., 2008; GUIGUEN et al., 2010). Em fêmeas adultas, a aromatase gonadal está presente em células da granulosa e da teca nos ovários, e a expressão do gene *cyp19a1a* é maior comparada aos machos, devido à importância do estrogênio no crescimento dos ovócitos e na síntese de VTG hepática (GOTO-KAZETO et al., 2004; RODRÍGUEZ-MARÍ et al., 2005; CAULIER et al., 2015; HINFRAY et al., 2017). Em peixes teleósteos machos, a aromatase gonadal está presente nas células de Leydig e nas células germinativas (KOBAYASHI et al., 2004; KOTULA-BALAK et al., 2008; VIÑAS; PIFERRER, 2008; GUIGUEN et al., 2010; VON SCHALBURG et al., 2013) e

o estrogênio apresenta funções no desenvolvimento testicular e na espermatogênese (MIURA et al., 1999, 2003).

A aromatase cerebral (*cyp19a1b*), é expressa exclusivamente em células radiais da glia, especificamente nas regiões periventriculares do telencéfalo e do encéfalo ventral, com os maiores níveis de expressão encontrados na área preóptica e no hipotálamo (FORLANO et al., 2001; TONG et al., 2009; RAMALLO et al., 2017). Os peixes, ao contrário de aves e mamíferos, mantêm alta atividade proliferativa dos neurônios na idade adulta e a manutenção das células gliais radiais com presença da aromatase e consequentemente do estradiol, apresentam funções na regulação da neurogênese e no reparo cerebral (CHESHENKO et al., 2008; BRETON et al., 2015).

Além da função neuroproterora, a aromatase cerebral apresenta funções importantes na reprodução. O cérebro dos teleósteos é um local com alto grau de síntese de estrógenos em virtude de um *feedback* auto regulatório positivo, onde a presença do estrogênio, o produto da aromatização, causa o aumento da expressão do gene *cyp19a1b* (DIOTEL et al., 2010). Em embriões de *Danio rerio* foi demonstrado que o aumento nos níveis de estrógenos locais, pela atuação da *cyp19a1b*, resulta no aumento de neurônios que liberam GnRH, hormônio diretamente envolvido na regulação do eixo HPGF (VOSGES et al., 2010, 2012), demonstrando que a expressão da aromatase cerebral pode interferir na regulação neuroendócrina. A aromatase cerebral também está envolvida no comportamento sexual e na diferenciação gonadal de teleósteos. Ocorre aumento na sua expressão quando os peixes apresentam comportamentos sexuais que resultam no acasalamento (CHESHENKO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2008; DIOTEL et al., 2010), e também durante a diferenciação gonadal (GONZÁLEZ; PIFERRER, 2003; DIOTEL et al., 2010; COUMAILLEAU et al., 2015).

Ambas as isoformas da aromatase estão envolvidas na regulação do ciclo reprodutivo, na diferenciação e no comportamento sexual em peixes teleósteos. A modulação de sua expressão pode alterar dramaticamente a taxa da produção de estrogênio, perturbando níveis locais e sistêmicos e resultando em graves consequências para as funções reprodutivas (CHESHENKO et al., 2008; HAN et al., 2010). Contaminantes como os desreguladores endócrinos podem induzir ou inibir a expressão da aromatase em peixes, portanto a análise de sua expressão pode ser utilizada como biomarcador na avaliação de substâncias sob investigação (HINFRAY et al., 2017).

A interferência dos desreguladores endócrinos sobre os hormônios sexuais pode resultar em danos a tecidos reprodutivos, resultando em alterações histopatológicas em

gônadas (MARCHAND; PIETERSE; BARNHOORN, 2008). Esses xenobióticos podem afetar a estrutura e função da gônada podendo causar alteração na maturação testicular, hiperplasia ou hipertrofia das células de Sertoli e Leydig, alterações no volume intersticial testicular, diminuição da produção de esperma e consequente redução do diâmetro dos túbulos seminíferos (MILES-RICHARDSON et al., 1999; LEINO; JENSEN; ANKLEY, 2005; YAMAMOTO et al., 2017). Ao afetar as células de Leydig, os desreguladores endócrinos podem ainda bloquear a espermatogênese, gerando diminuição do número de células germinativas e diminuição do número e da qualidade de células espermáticas (MILNES et al., 2006; BRANDER, 2013). Todas essas alterações resultam em efeitos adversos como diminuição da fertilidade, trazendo graves consequências para a reprodução de animais aquáticos (OLIVEIRA; BARATA; PIÑA, 2015).

Além das alterações histopatológicas, os desreguladores endócrinos podem afetar o índice gonadossomático (IGS), que é dado pelo peso da gônada dividido pelo peso do corpo do animal. Em geral, o IGS é reduzido após a exposição a compostos estrogênicos ou antiandrogênicos e o seu declínio pode ser ligado à inibição do desenvolvimento testicular (HACHFI et al., 2012). A avaliação desse biomarcador é uma maneira simples de avaliar a disfunção gonadal e embora possa ocorrer variação durante o ciclo reprodutivo de machos, é uma variável biológica relevante para avaliar os efeitos crônicos causados pelos poluentes (LOUIZ; BEN-ATTIA; BEN-HASSINE, 2009).

Os desreguladores endócrinos afetam o sistema reprodutivo de peixes alterando o eixo HPGF em diferentes níveis, e gerando respostas que podem ser utilizadas como biomarcadores (HACHFI et al., 2012). A avaliação de biomarcadores de forma isolada gera respostas fragmentadas (GAGNON; RAWSON, 2016), e se torna ineficiente para avaliar os efeitos de contaminantes sobre o eixo reprodutivo de peixes. O eixo HPGF funciona de forma integrada, por exemplo, sabe-se que níveis anormais de esteroides e síntese de VTG em machos podem resultar em atraso de maturação gonadal (DUFFY et al., 2014) e diminuição do índice gonadossomático (PARK et al., 2010). Por isso, a integração de biomarcadores para avaliação de desreguladores endócrinos é necessária e representa uma estratégia eficiente para avaliar os efeitos dos contaminantes sobre a reprodução dos peixes (YAMAMOTO et al., 2017).

2.3 MODELO DE ESTUDO: *Rhamdia quelen*

Os peixes são considerados modelos experimentais adequados para avaliações toxicológicas ambientais (GOVIND, 2011). Para avaliação dos efeitos tóxicos do ibuprofeno, foi utilizado como modelo de estudo o peixe de água doce da espécie *Rhamdia quelen* (Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae), popularmente conhecido como jundiá (FIGURA 4).

FIGURA 4 - EXEMPLAR DE *Rhamdia quelen*



FONTE: GUILOSKI, 2013.

É uma espécie encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México, vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento. Adultos de *Rhamdia quelen* são omnívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos (GOMES et al., 2000).

A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos. Os machos iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4cm e as fêmeas com 16,5cm. A partir de 16,5cm e 17,5cm, todos os exemplares machos e fêmeas, respectivamente, estão potencialmente aptos para reprodução (NARAHARA; GODINHO; ROMAGOSA, 1985). A espécie é ovulípara, as fêmeas e os machos lançam seus gametas na água, ocorrendo a fecundação neste ambiente (fecundação externa) (GOMES et al., 2000). A desova dessa espécie é assincrônica, uma vez que os ovos são liberados em várias ocasiões do período reprodutivo. A fecundidade é baixa e apresenta relação com o comprimento total, peso total e peso da gônada (NARAHARA; GODINHO; ROMAGOSA, 1989).

Esta espécie nativa de peixe apresenta grande importância econômica na Região Sul do Brasil, pois se adaptada bem a diferentes ambientes, é amplamente utilizada nos viveiros de piscicultura e de boa aceitação no mercado consumidor (BOMBARDELLI et al., 2006). O peixe apresenta carne saborosa e com boa textura, sem espinhos intramusculares, além de ter facilidade de manejo e crescimento acelerado, inclusive nos meses mais frios (CANTON et al., 2007).

Além de sua importância econômica, o *Rhamdia quelen* tem demonstrado ser um bom modelo de estudo para avaliação de contaminantes ambientais. Diversos autores utilizaram a espécie como modelo de estudo, analisando biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade, osmorregulatórios, histopatológicos e de desregulação endócrina (BECKER et al., 2009; PAMPLONA et al., 2011; MELA et al., 2013a; GUILOSKI et al., 2015, 2017; GHELFI et al., 2016; PEREIRA et al., 2016b) e a mesma se mostrou sensível e adequada para avaliar os efeitos dos contaminantes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do fármaco ibuprofeno em peixes da espécie *Rhamdia quelen* expostos à contaminação por via hídrica pelo período de 14 dias, utilizando biomarcadores bioquímicos, de genotoxicidade, osmorregulatórios, hematológicos e de desregulação endócrina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após a exposição dos peixes ao ibuprofeno, verificar se o fármaco:

- Afeta o sistema antioxidante e o sistema de biotransformação em brânquia, fígado e rim posterior;
- Causa neurotoxicidade;
- Causa genotoxicidade em rim posterior, fígado e sangue;
- Altera o índice hepatossomático;
- Afeta a osmorregulação;
- Afeta as células de defesa;
- Tem efeito desregulador endócrino.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO IBUPROFENO EM PEIXES MACHOS DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen*

Artigo: Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*

Artigo publicado na revista Environmental Toxicology and Pharmacology

DOI: 10.1016/j.etap.2018.03.008

Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*

Francielle Tatiana Mathias, Douglas Henrique Fockink, Geonildo Rodrigo Disner, Viviane Prodocimo, João Luiz Coelho Ribas, Luiz Pereira Ramos, Marta Margarete Cestari, Helena Cristina da Silva de Assis

Abstract

Ibuprofen is a pharmaceutical drug widely used by the global population and it has been found in aquatic ecosystems in several countries. This study evaluated the effects of ibuprofen in environmental concentrations (0, 0.1, 1 and 10 µg/L) on the freshwater species *Rhamdia quelen* exposed for 14 days. In the posterior kidney, ibuprofen increased glutathione-S-transferase activity in all groups exposed. Furthermore, increased glutathione peroxidase activity and the levels of reduced glutathione in the group exposed to 10 µg/L. Ibuprofen decreased the carbonic anhydrase activity in the posterior kidney in all exposed groups, and increased the activity in the gills in group exposed to 0.1 µg/L. The levels of plasma magnesium increased in groups exposed to 0.1 and 1 µg/L. In the blood, ibuprofen decreased the white blood cell count in groups exposed to 0.1 e 1.0 µg/L. Therefore, these results indicated that ibuprofen caused nephrotoxicity and demonstrated immunosuppressive effect in *Rhamdia quelen*.

Keywords: Ibuprofen; Biotransformation; Antioxidant system; Osmoregulation; Immunosuppression.

1 Introduction

Pharmaceutical detection in effluents and surface waters has been increasing exponentially in the last years due to higher prescriptions and consumption by the population. Thus, causing concern about the environmental impact and human health (Santos et al., 2013). Different from other contaminants, pharmaceuticals are biologically active molecules and the mechanisms which act in humans are relatively conserved in animal phyla, increasing the probability of the biological effects to remain in non-target species such as fish (Corcoran et al., 2010; Donnachie et al., 2016).

In general, wastewater is directed to sewage treatment plants, which have a key role in the entry of pharmaceuticals into environment (Santos et al., 2010). These compounds are not easily removed from the water by conventional processes in the treatment plants, due to physicochemical properties (Ebele et al., 2017). This causes their detection in surface waters (Kim et al., 2009), effluents (Larsson et al., 2007) and drinking water (Benotti et al., 2009). At these sites the majority of the pharmaceuticals are present at low concentrations ($\mu\text{g/L}$ or ng/L), however chronic exposure may be responsible for unknown toxicological impacts (Ferreira, 2014).

The class of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is among therapeutic classes most commonly found in the aquatic environment (Santos et al., 2010). NSAIDs act by reversible or irreversible inhibition of one or both isoforms of the enzyme cyclooxygenase, COX-1 and COX-2, responsible for prostaglandin synthesis from arachidonic acid, with therapeutic effects of reducing inflammation and pain (Corcoran et al., 2010). Several studies demonstrated the presence of COX; the main target of the NSAIDs, in different fish species, (Choe et al., 2006; Mehinto et al., 2010; Zou et al., 1999) as well as the reduction of prostaglandins in fish exposed to ibuprofen (Bhandari and Venables, 2011; Morthorst et al., 2013).

Prostaglandins are formed in vertebrates and invertebrates, performing an important variety of physiological roles (Fent et al., 2006). In fish, prostaglandins are involved in homeostatic functions in osmoregulation (Choe et al., 2006), immunity (Gómez-Abellán and Sepulcre, 2016), reproduction (Hayashi et al., 2008) and the hematological system (Yeh and Wang, 2006).

Ibuprofen is a drug belonging to NSAIDs and is widely used as an analgesic, antipyretic and anti-inflammatory. It is produced in large quantities, available in various formulations worldwide and is one of the main medications listed in the Essential Drugs List of The World Health Organization (Han et al., 2010). Ibuprofen has been detected in surface waters and wastewater of many countries such as the United States, Germany, Spain and Brazil at concentration range from 0,001 to 117 $\mu\text{g/L}$ (Ebele et al., 2017).

The toxicity of ibuprofen has been demonstrated in different aquatic organisms. In zebrafish exposed to sublethal concentrations (0.0001 to 25 mg/L) for 28 days oxidative stress was observed (Bartoskova et al., 2013), and also in common carp exposed 12 to 96 h at 17.6 mg/L (Islas-Flores et al., 2014). In bivalves (*Dreissena polymorpha*) exposed for 96 h to environmentally relevant concentrations (Parolini et al., 2011) and in *Daphnia magna* exposed for 48 h at 2.9 mg/L (Gómez-Oliván et al., 2014) DNA damage and oxidative stress

were observed. Hematological changes were observed in Indian major carp (Saravanan et al., 2012) exposed to 14.2 mg/L over 35 days. Studies with zebrafish embryos revealed that ibuprofen is metabolized and excreted in a similar way to mammals (Jones et al., 2012) and interferes in early development, organogenesis, larval growth and survival (David and Pancharatna, 2009). Ibuprofen also affected embryo locomotivity and caused neurotoxicity in *Danio rerio* at 5, 50 500 µg/L in 6 to 96 h postfertilization exposure (Xia et al., 2017).

Some of these studies used ibuprofen concentrations in the range of mg/L (Gómez-Oliván et al., 2014; Islas-Flores et al., 2014; Saravanan et al., 2012), which were not usually found in the environment. There are few studies that integrate several biomarkers and this is important to verify responses in different tissues and systems and evaluate the overall impact of the contaminant on fish. In addition, the toxicity of a contaminant may vary according to the species. Therefore, is important to evaluate species from different regions of the world; especially neotropical fish which have very limited data available in the literature.

The low ibuprofen concentrations tested in this study, reflect the conditions found in the aquatic environment (Corcoran et al., 2010). *Rhamdia quelen* is a freshwater neotropical species, found from central Argentina to southern Mexico, living in lakes and deep parts of rivers (Gomes et al., 2000). It has been used as a study model to evaluate the effects of environmental contaminants (Becker et al., 2009; Guiloski et al., 2015; Mela et al., 2013b; Pereira et al., 2016). The aim of this study was to evaluate toxic effects of ibuprofen in concentrations 0.1, 1.0 e 10 µg/L on fish *R. quelen*, using biochemical, genotoxic, physiological and hematological biomarkers.

2 Material and Methods

2.1 Animals

Adult male fish of the species *R. quelen* were obtained in pisciculture in the metropolitan region of Curitiba, Paraná, Brazil. Animals were maintained with photoperiod of 12 hours, in filtered water, constant aeration, temperature $22.5 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$. They were fed with commercial ration (MP 31Brazil) once a day during the acclimation and ibuprofen exposure. The project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Paraná, under No. 788/2014 and the protocols were in accordance with International Guidelines for Animal Use.

2.2 Bioassay

The fish were acclimated in a laboratory for 30 days using glass aquarium (120 L capacity). After the acclimation period they were divided into 4 groups (n=10 per group) one control group (solvent acetone) and three groups exposed to nominal ibuprofen concentrations 0.1, 1 and 10 µg/L (Ibuprofen, I4883-1G, CAS number 15687-27-1, powder, purity ≥ 98%, Sigma Aldrich). The concentration 1 µg/L was selected because it was found in the aquatic environment (Corcoran et al., 2010), and concentrations ten times lower and ten times higher were also tested. Ibuprofen was diluted in water to obtain a stock solution 100mg/L, with addition of acetone (6 ml/L) for complete solubilization. The stock solution was added in the appropriate volume to the aquarium water to obtain the final tested concentrations. The exposure was semi-static, and every 24 hours half of the water was changed and ibuprofen was replaced to keep nominal concentrations. This procedure was based on ibuprofen degradation experiment obtained with the chemical analysis described below.

After 14 days of exposure, the animals were anesthetized with benzocaine 1%, the blood was collected through a caudal vein puncture and fish were euthanized by spinal cord section. Animals were weighed and total length was measured. The liver was weighed for determination of hepatosomatic index (HSI) using the formula: $HSI = (\text{Liver weight} / \text{Whole body weight}) \times 100$. The brain, liver, posterior kidney and gills were collected and stored at -80°C for posterior analyses.

Water parameters, including dissolved oxygen, total ammonia, toxic ammonia, alkalinity, pH and temperature were monitored during the bioassay.

2.3 Ibuprofen chemical analysis

2.3.1 Definition of drug replacement time

In order to define the time to replace ibuprofen during the bioassay, an experiment to evaluate the decrease in concentration of the drug was performed. The experiment consisted of the exposure of 12 fish (*R. quelen*, approximately 30g each fish) to ibuprofen at 10 µg/L in a 46 L glass aquarium. Water samples at times 0 (1 hour after drug addition), 24 and 48 h were collected. Samples of 1 L were extracted with approximately 150 mL of dichloromethane (divided 3 times), the organic solvent was evaporated, and then, 5 mL of water was added in order to increase the concentration 200 times. The extraction procedure

was also performed with a standard solution of ibuprofen at 10 µg/L and it was possible to extract 100% of the drug.

The ibuprofen quantification in the samples was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Metrohm chromatographic system model 882 Compact IC Plus, coupled with an automatic sampler and UV/Vis detector. The analysis was performed using a C18 column (150x4.6mm, 5µm, Phenomenex) at 25° C, eluted with mobile phase 80% methanol and 20% water acidified with phosphoric acid, at a flow rate of 1.0 mL/min and detection at 250 nm. Quantifications were performed by an external calibration in the concentration range of 1 to 20 mg/L of ibuprofen.

2.3.2 Ibuprofen concentration during the bioassay

Water samples were withdrawn from aquarium at 10 µg/L ibuprofen in the times of 0, 24h, 48h, 168h (7 days) and 336h (14 days) before and after the ibuprofen replacement. The sampling was carried out always one hour after the addition of the drug. The quantification of ibuprofen was performed by the same HPLC system mentioned above; however, in this case there was no extraction with dichloromethane. The ibuprofen was detected with the addition of a standard solution at 10 mg/L in each sample, thus, by subtraction of the standard concentration; the real concentration of the sample in µg/L was revealed.

With the other concentrations at 0.1 and 1 µg/L, the same degradation profile was assumed, since it was not possible to confirm the ibuprofen concentration due to methodology limitations.

2.4 Biochemical biomarkers

Biochemical analyses were carried out in the gills, liver, posterior kidney and brain. The gills, liver and posterior kidney were homogenized at 1:10 w/v in phosphate buffer (0,1M, pH 7.0), and centrifuged 15.000 x g at 4°C for 30 minutes. The supernatant was used to determine enzyme activity. In the gills, liver and posterior kidney were measured the activities of enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD), evaluation of reduced glutathione (GSH) concentration and evaluation of lipid peroxidation (LPO) levels. In liver was measured

ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. In the liver and posterior kidney was measured protein carbonyl (PCO) concentration.

The CAT activity was assayed according to Aebi (1984), measured at 240 nm. The GPx activity was measured at 340 nm based on the method of Hafeman et al. (1974). The GST activity was assayed according to Keen et al. (1976), at 340 nm. The SOD activity was measured following the method of Gao et al. (1998), at 440 nm. The EROD activity was assayed by fluorimetry at 530 nm of excitation and 590 nm of emission, using the method described by Burke and Mayer (1974). The analysis of GSH concentration was measured at 415 nm by Sedlak and Lindsay (1968) method. LPO levels was analyzed by method of Jiang et al (1992) at 560 nm and PCO concentration was measured at 363 nm and performed by Levine et al. (1994) method.

The brain was homogenized at 1:10 (w/v) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and centrifuged 10.100 x g at 4°C for 20 minutes. The supernatant was used for measured the acetylcholinesterase (AChE) activity, based in Ellman et al. (1961).

The protein concentration for the biochemical and osmoregulation biomarkers was determined according to Bradford (1976).

2.5 Biomarkers for genotoxicity

The piscine micronucleus test (PMNT) and nuclear morphological changes in erythrocytes was performed with the methodology based in Heddle (1973) and Schmid (1975). The blood was placed on a clean slide for smear, fixed with absolute ethanol for 15 minutes and stained with 10% Giemsa diluted in phosphate buffer (pH 6.8). The frequency of the micronucleus and nuclear morphological changes was analyzed according to Carrasco et al. (1990) in 1.000 cells per slide using blind test in an optic microscope (1000x magnification).

The comet assay (alkaline version) for the posterior kidney and liver was analyzed according to Singh et al. (1988) with minor modifications by Ferraro et al. (2004). The tissue was desegregated mechanically with homogenizer in 500 µL of fetal bovine serum and 30 µL of the homogenate was resuspended in 120 µL of 0.5% low-melting point agarose. This was placed on a microscope slide pre-coated with normal agarose 1.5%. The slides were incubated under refrigeration for 24 h in a lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 10; 1% Triton X-100, 1% *N*-lauryl-sarcocinate and 10% DMSO). To unwind the DNA, slides were kept for 25 min in an alkaline buffer (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH >

13) for 25 min at 4°C. Electrophoresis was performed for 25 min at 1 V/cm (25 V; 300 mA) and the slides were neutralized for 15 min with a buffer (0.4 M Tris, pH 7.4). They were fixed with absolute ethanol for 5 minutes and stained with ethidium bromide. Comets were scored using a Zeiss epifluorescence microscope. For each fish, 100 nucleoids were analyzed utilizing the visual classification based on the migration of DNA fragments from the nucleus of class 0 (no visible damage), class 1 (little damage), class 2 (medium damage), class 3 (extensive damage) and 4 (maximally damaged). The score was calculated by multiplying the number of nuclei found in a class times the class number.

2.6 Osmoregulation biomarkers

Plasma chloride and magnesium determination was assayed colorimetrically with commercially available kits (Labtest, Brazil) and absorbances read respectively at 470 and 505 nm, in samples appropriately diluted in deionized water.

For the carbonic anhydrase activity (CAA) analysis, the gills and posterior kidney were weighed and homogenized at 10% w/v with phosphate buffer (10 mM, pH 7.4). The homogenate was centrifuged 2.000 x g at room temperature for 5 minutes and the supernatant was aliquoted for the protein and CAA assays. CAA was assayed according to the method described by Vitale et al. (1999) based on Henry (1991), and described in Prodocimo et al. (2015). Cold water (~4°C) saturated with CO₂ was added to the buffer containing the tissue homogenate and pH reduction was monitored along 20 sec, with readings every 4 sec. The slope of the regression line of pH reduction along time results in the catalyzed rate of activity of the carbonic anhydrase present in the sample (Henry, 1991; Vitale et al., 1999).

2.7 Hematological biomarker

Hematological biomarker was performed in white blood cells. The total and differentiated leukocyte count was carried out according to Tavares-Dias et al. (2002, 1999). The white blood cells were classified into neutrophils, lymphocytes, monocytes and thrombocytes.

2.8 Statistical analysis

Data analysis was preceded by the Kolmogorov–Smirnov normality test and Bartlett's test for homogeneity of variance. For parametric data, a one-way analysis of variance (ANOVA) was applied followed by the Neuman-Keuls test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was applied and followed by Dunn's test. Significance was considered when $p < 0.05$

3 Results

3.1 Bioassay

No mortality was observed during the bioassay. The weight of the animals was 121.5 ± 77.0 g and the total length was 23.5 ± 4.5 cm. The HSI did not change in the groups exposed to ibuprofen when compared to the control group (ANOVA/Neuman-Keuls). The HSI values were: control group (1.1 ± 0.08), 0.1 $\mu\text{g/L}$ (1.6 ± 0.2), 1 $\mu\text{g/L}$ (1.4 ± 0.1) and 10 $\mu\text{g/L}$ (1.3 ± 0.1).

The water parameters were monitored during the bioassay as followed: dissolved oxygen (8.0-11.0 mg/L), total ammonia (0.25-3.5 mg/L), toxic ammonia (0.001-0.013 mg/L), alkalinity (50-150 mg/L CaCO_3), pH (6.6 – 6.8 units) and temperature ($22.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$). There were no differences in the parameters evaluated among the groups (Kruskal-Wallis/Dunn's test).

3.2 Chemical analysis

3.2.1 Definition of drug replacement time

The water analysis at 0, 24 and 48 hours showed that the drug concentration decreased around 55% in 24 h and approximately 72% in 48 h. Thus, in order to facilitate the calculations and to improve the accuracy it was chosen replace 50% of the concentration of drug every 24 hours.

3.2.2 Ibuprofen concentration during the bioassay

The water analysis for the group exposed at 10 $\mu\text{g/L}$ ibuprofen demonstrated a mean value of 9.1 ± 2.1 $\mu\text{g/L}$ (mean \pm standard deviation of mean, Table 1). Therefore, the analysis revealed that the drug replacement time chosen was adequate in order to maintain the concentration constant and close to the nominal value throughout the bioassay.

Table 1

Water ibuprofen concentrations in group exposed to 10 µg/L during the bioassay

Time (hours)	Concentration (µg/L)
0 (1 hour after ibuprofen addition)	11.1 ± 0.02
24 before replacement	8.0 ± 0.40
24 after replacement	10.4 ± 0.03
168 before replacement	6.2 ± 0.20
168 after replacement	10.3 ± 0.80
336 before replacement	6.8 ± 0.30
336 after replacement	11.0 ± 1.10

Values are expressed as mean ± standard deviation of mean.

3.3 Biochemical biomarkers

In the posterior kidney, ibuprofen increased the GST activity in all exposed groups and increased the GPx activity and GSH concentration in the group exposed to 10 µg/L when compared to the control group. The SOD and CAT activities, LPO and PCO were not altered by ibuprofen (Fig. 1, A-G). AChE activity increased in the brain of fish exposed to 1 µg/L of ibuprofen and the concentrations of 0.1 and 10 µg/L did not alter AChE enzyme activity (Fig. 1, H).

Biochemical biomarkers in the liver and in the gills showed there were no statistical differences in groups exposed to ibuprofen when compared to the control group (Table S1 and Table S2).

3.4 Biomarkers for genotoxicity

Comet assay in the posterior kidney and liver (Table S3) and the total morphological changes (including micronucleus) in the erythrocytes revealed that there were no significant differences between the exposed groups to ibuprofen and the control group (Kruskal-Wallis/Dunn's test). For total morphological changes the values of frequencies were: control group (0.3 ± 0.1), 0.1 µg/L (0.2 ± 0.06), 1µg/L (0.2 ± 0.03) and 10 µg/L (0.1 ± 0.05).

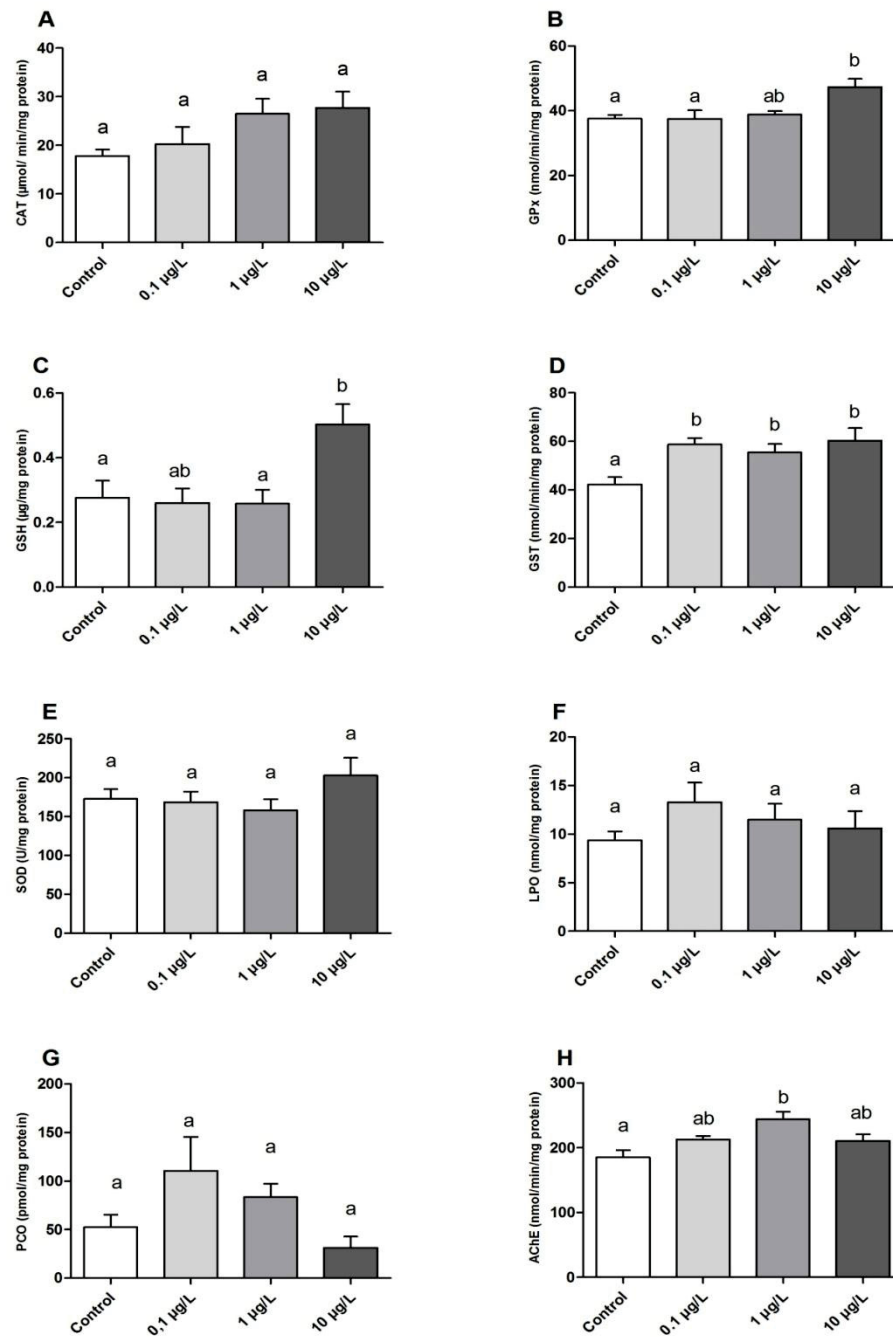


Fig. 1. Biochemical biomarkers in posterior kidney and in brain of *R. quelen* exposed to ibuprofen. A-Catalase (CAT), B-Glutathione peroxidase (GPx), C-Reduced glutathione (GSH), D-Glutathione S-transferase (GST), E-Superoxide dismutase (SOD), F-Lipid peroxidation (LPO), G-Protein carbonylation (PCO), H- Acetylcholinesterase (AChE). Values are expressed as mean \pm standard error of mean. Different letters indicates significant differences among groups ($p < 0.05$). CAT, GSH, PCO: Kruskal-Wallis/ Dunn's test. GPx, GST, SOD, LPO, AChE: ANOVA/Newman-Keuls.

3.5 Osmoregulation biomarkers

The analysis of the plasma chloride demonstrated that there was no change in the groups exposed to ibuprofen when compared to the control group. Plasma magnesium increased in the groups exposed to 0.1 and 1 $\mu\text{g/L}$ of ibuprofen when compared to the control group. Analysis of the carbonic anhydrase activity demonstrated that in the posterior kidney, ibuprofen decreased enzymatic activity in all the groups exposed. Enzymatic activity of the carbonic anhydrase in the gills increased in group exposed to 0.1 $\mu\text{g/L}$ when compared to the control group (Fig.2, A-D).

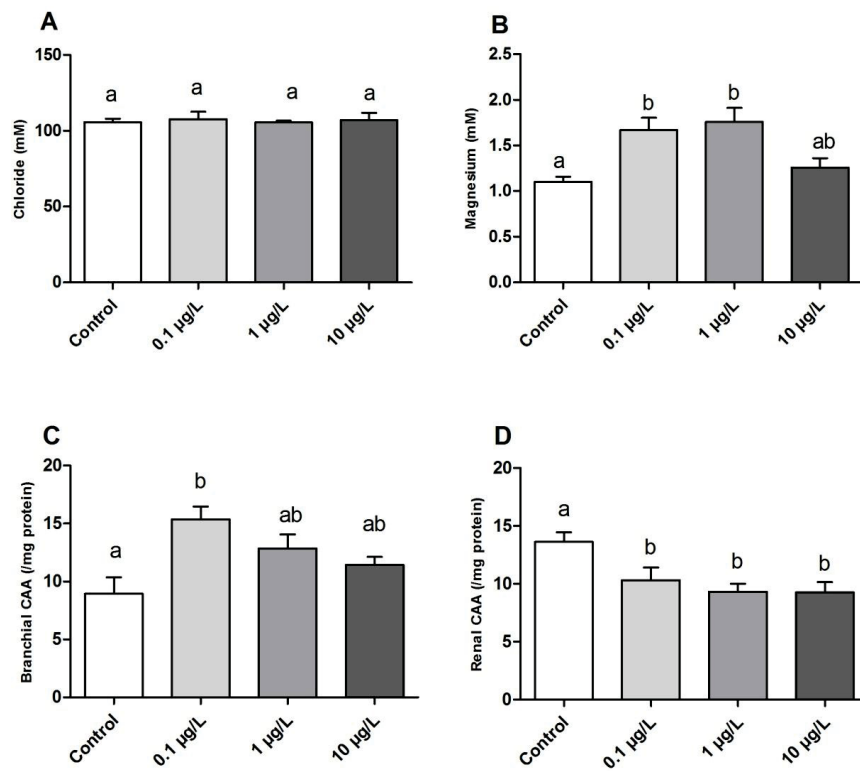


Fig.2. Osmoregulation biomarkers in *R. quelen* exposed to ibuprofen. A-Plasma chloride concentration, B-Plasma magnesium concentration, C-Branchial carbonic anhydrase activity (CAA), D- Renal carbonic anhydrase activity (CAA). Values are expressed as mean \pm standard error of mean. Different letters indicates significant differences among groups ($p < 0.05$). Branchial CAA, Renal CAA: ANOVA/Newman-Keuls. Plasma chloride and magnesium concentration: Kruskal-Wallis/Dunn's test.

3.6 Hematological biomarker

The total numbers of leukocyte, as well as neutrophils, lymphocytes, monocytes and thrombocytes count decreased in the groups exposed to 0.1 and 1 µg/L of ibuprofen when compared to the control group (Table 2).

Table 2
Hematological biomarker in *R. quelen* exposed to ibuprofen.

	Ibuprofen concentrations			
	Control	0.1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L
Leukocytes (10 ³ /µL)	30.3 ± 1.4 ^a	5.8 ± 0.9 ^b	6.0 ± 0.6 ^b	26.0 ± 1.5 ^a
Neutrophils (10 ³ /µL)	2.6 ± 0.2 ^a	0.05 ± 0.03 ^b	0.1 ± 0.04 ^b	0.9 ± 0.09 ^a
Lymphocytes (10 ³ /µL)	22.7 ± 2.0 ^a	6.0 ± 0.8 ^b	5.0 ± 0.6 ^b	20.2 ± 2.0 ^a
Monocytes (10 ³ /µL)	1.4 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.05 ^b	0.4 ± 0.06 ^b	1.0 ± 0.09 ^a
Thrombocytes (10 ³ /µL)	12.9 ± 0.3 ^a	9.2 ± 0.8 ^b	8.2 ± 0.6 ^b	12.3 ± 0.4 ^a

Values are expressed as mean ± standard error of mean. Different letters indicates significant differences among groups (p < 0.05). Leukocytes, neutrophils: Kruskal-Wallis/Dunn's test. Lymphocytes, Monocytes, Thrombocytes: ANOVA/Newman-Keuls

4 Discussion

Biochemical analyses in the posterior kidney showed that ibuprofen affected the biotransformation and antioxidant system with an increase in GST and GPx activity and in GSH concentration. It has already been shown that NSAIDs can induce oxidative stress (Gómez-Oliván et al., 2014) which is caused by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defense system. The enzymes GST, GPx and GSH concentration increased through ibuprofen exposure in our study are part of an antioxidant defense for ROS elimination, and probably this increase is responsible for no changes for LPO, PCO and comet assay in the posterior kidney.

In addition to the antioxidant function, GST is an important enzyme for conjugation and subsequent metabolism of endogenous compounds (Quinn et al., 2011) and several authors have demonstrated their increase after different ibuprofen concentration exposures (Bartoskova et al., 2013; Contardo-Jara et al., 2011; Milan et al., 2013; Parolini et al., 2011). Milan et al. (2013) confirmed GST function in metabolism and the detoxification of ibuprofen on bivalve *Ruditapes philippinarum*. They showed genes that encode proteins for GST were positively correlated with ibuprofen levels and over-transcribed after animal exposure.

In the brain, AChE activity increased in fish exposed to 1 µg/L of ibuprofen. Therefore, the activity values found can be considered normal to this species. We did not observe any behavioral effects on fish and, the values of activity are similar with other studies

from our research group for *R. quelen* (Mela et al., 2013a, 2013b). However, it is possible that ibuprofen alters the AChE activity, since NSAIDs also act on the central nervous system; besides the classical peripheral mechanism of COX inhibition (Voilley et al., 2001).

Ibuprofen did not alter the biochemical biomarkers in the liver and gills, different from the kidney. Pharmaceuticals can act on antioxidant defenses through different ways and this can vary according to the tissue (Milan et al., 2013). The HSI did not change in the exposed animals, demonstrating that this organ was not affected by ibuprofen.

Ibuprofen did not affect DNA integrity in the posterior kidney and liver, evaluated using the comet assay. Rocco et al. (2010) evaluated ibuprofen effects on *Danio rerio* at a concentration of 66.4 ng/ μ L for 28 days and observed DNA damage at day 5 and day 28 of exposure but no damage was observed from 14 days of exposure. According to the authors, ibuprofen showed an alternation between the damage and repair during exposure time. In addition, genotoxicity was not observed for *R. quelen* exposed at low concentrations of diclofenac for 96 hours in the liver and posterior kidney (Ghelfi et al., 2016) and in a subchronic exposure of 21 days in liver (Guiloski et al., 2017a).

For ibuprofen in *R. quelen*, the increase of GST and GPx activity and an increase of GSH concentration might avoid DNA damage in the posterior kidney. A negative correlation between GST and DNA damage in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) exposed to diclofenac has already been shown by Quinn et al. (2011).

Groups exposed to ibuprofen showed no differences in the micronucleus and in nuclear morphological alteration frequencies compared to the control group. PMNT is one of the most used tests for the detection of mutagenicity by the occurrence of chromosomal breaks and losses. Fish in general, have a low hematopoietic index and their erythrocytes can remain in circulation for periods ranging from 60 to 160 days, depending on the species (Tavares-Dias and Moraes, 2004). Probably just a few erythrocytes have been produced during the experimental period, justifying that only a few abnormalities were found. In addition, DNA damage was not observed in the tested concentrations of ibuprofen.

The analysis of osmoregulation revealed important effects of ibuprofen. Plasma chloride and magnesium concentrations measured in *R. quelen* were compatible with levels previously reported for those same species (Mela et al., 2013a, 2013b; Souza-Bastos and Freire, 2009) and were also compatible with levels reported for other freshwater teleosts (e.g. Evans and Claiborne, 2009).

Ibuprofen exposure did not affect plasma chloride homeostasis in *R. quelen*. As this monovalent ion is regulated by the gills (e.g. Evans and Claiborne, 2009; Marshall and

Grosell, 2006), transport of chloride by the branchial epithelium was not affected. A similar response was observed in rainbow trout exposed to 1 mg/mL of ibuprofen for 4 days, where no changes in chloride or sodium were observed, indicating NaCl homeostasis maintenance (Gravel et al., 2009).

In addition, the branchial carbonic anhydrase activity (CAA) was elevated in the group exposed to 0.1 µg/L of ibuprofen. The carbonic anhydrase is a crucial branchial enzyme, that acts on acid base regulation, respiration and ion uptake in freshwater fish (Evans et al., 2005; Lionetto et al., 2012; Marshall and Grosell, 2006; Polo and Scrimshaw, 2012), and has been shown to be sensitive to the presence of pollutants of several classes (Lionetto et al., 2012). The activation on CAA observed in the gills after exposed to 0.1 µg/L ibuprofen could be could be a compensatory response associated with its role in plasma ion uptake (compatible with the maintenance of plasma chloride) or acid base regulation in order to maintain the homeostasis (Evans and Claiborne, 2009; Marshall and Grosell, 2006; Mela et al., 2013a; Prodocimo et al., 2015). Gills CAA increased was not directly related to the concentration of ibuprofen (concentration-response), and same compensatory response was observed for renal CAA in *Rhamdia quelen* exposed to copper (Mela et al., 2013a) and for gill CAA in estuarine species *Sphoeroides testudineus* exposed to impacted environment (Prodocimo et al., 2015).

Magnesium is a divalent plasma ion regulated by the kidney through glomerular filtration followed by intense tubular reabsorption (Beyenbach, 2000; Freire et al., 1996; Marshall and Grosell, 2006; Prodocimo and Freire, 2001). The increased plasma magnesium levels (observed at 0.1 and 1.0 µg/ L in comparison to control) can be related to the reduced glomerular filtration in the posterior kidney by ibuprofen. The inhibition of activities of the renal carbonic anhydrase observed in all groups exposed to ibuprofen indicated its nephrotoxic effect, compatible with magnesium data. In the kidney, carbonic anhydrase acts in the systemic acid base regulation reabsorbing HCO_3^- and secreting H^+ for urine acidification (revised in Gilmour and Perry, 2009). The inhibition of CAA was responsible for significant decrease in renal net acid excretion, increase in urinary losses of Na^+ and HCO_3^- , which can lead to ionic and acid-base imbalance. These changes are compensated by adjustments of branchial CAA and ion transfers (revised in Gilmour and Perry, 2009).

Genes involved in osmoregulation were down regulated by exposure of 1.15 mg/L of ibuprofen (high concentration) for estuarine fish *Menidia beryllina*, suggesting a decrease in osmoregulatory ability (Jeffries et al., 2015). In this study the ibuprofen concentration was

lower and changes in the carbonic anhydrase activity and plasma magnesium indicate changes in the ionic osmotic balance.

In general, ibuprofen demonstrated more evident damage in the posterior kidney compared to the liver and gills; evidenced by biochemical and osmoregulation biomarker responses. The changes did not reach a genetic level, but perhaps long-term exposure could cause changes. Others studies with NSAIDs also showed this pattern of kidney damage (Ghelfi et al., 2016; Mehinto et al., 2010; Pamplona et al., 2011). This can be related with the action mechanism of NSAIDs in humans that inhibit synthesis of prostaglandins; and consequently, affect renal homeostasis, particularly renal glomerular filtration (Fent et al., 2006). In fish, it was demonstrated that NSAIDs decreasing COX 1 e COX 2 expression in the posterior kidney (Mehinto et al., 2010) and decreasing prostaglandins (Bhandari and Venables, 2011; Morthorst et al., 2013). Therefore, posterior kidney damage observed in our study, can be related with ibuprofen effects on prostaglandins and changes in renal homeostasis.

Hematological biomarker showed an immunosuppressive effect in groups exposed to 0.1 e 1.0 $\mu\text{g/L}$ of ibuprofen. As in mammals, fish have innate and adaptive immunity and white blood cells are able to kill foreign cells (Fischer et al., 2006). Neutrophils and monocytes are responsible for phagocytosis of pathogens, an essential step for innate immunity (Ferdous and Scott, 2015) and lymphocytes and trombocytes are part of the defense mechanism in the adaptive immune response (Ferdous and Scott, 2015; Fischer et al., 2006). Thrombocytes also present phagocytic activity (Nagasawa et al., 2015). A decrease in cells number of the immune system predisposes fish to diseases because it alters their ability to combat pathogens.

The decrease observed in white blood cells was not concentration dependent since the parameters were not altered in the highest concentration of ibuprofen. Probably, this result is in a non monotonic concentration-response curve, where statistical analysis indicates that lower doses results in a decrease in response with significant effects compared to controls and high doses results in an increase in response without significant effects compared to controls (Vandenberg, 2014). Non monotonic curves for biological responses at extremely low concentrations has been demonstrated to contaminants such bisphenol-A and atrazina (Vandenberg et al., 2012), but in recent years this kind of effect has been accept also for pharmaceuticals and personal care products (Wilkinson et al., 2016). The mechanisms that causing non-monotonicity is currently not well understood, but may be a result of the receptor

saturation that occur when all available receptors are occupied and no further increase in contaminant concentrations can result in an increased response (Welshons et al., 2003).

Immunosuppressive effect of ibuprofen in the range of nanograms also was observed for *in vitro* experiments, in an exposure to the primary culture of the monocytic lineage of *Hoplias malabaricus* anterior kidney (Ribas et al., 2014). For diclofenac after trophic exposure, similar immunosuppressive effect was verified. There was a decrease in the total leukocyte count with a reduction in neutrophils, lymphocytes and monocytes in *Hoplias malabaricus* exposed at doses of 0.2, 2.0 and 20.0 µg/kg (Ribas et al., 2016).

Therefore, some studies have demonstrated an increase in the white blood cell count of fish exposed to NSAIDs; controversially to our study with ibuprofen. This response was observed in fish exposed to diclofenac for 96 hours (Ghelfi et al., 2016; Saravanan et al., 2011) to paracetamol for 21 days (Guiloski et al., 2017b) and to ibuprofen for 35 days (Saravanan et al., 2012). The different effects can be related to the exposure time and the different action mechanism for paracetamol (Jozwiak-Bebenista and Nowak, 2014)

5 Conclusion

The data demonstrated that ibuprofen caused nephrotoxicity due to the inhibition of activities of the renal carbonic anhydrase observed in all groups exposed in agreement with the plasma magnesium data. Ibuprofen also caused an increase in glutathione system with some effects only observed at the highest tested concentration. An immunosuppressive effect in lowest and intermediate concentrations was revealed. Thus, a long-term exposure at low concentrations of ibuprofen can cause health effects to *R. quelen* from an exposure of 14 days.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology). The authors thank G.A. Torres for help in the analysis of the physiological data.

Supplementary data

Table S1Biochemical biomarkers in the liver of *R. quelen* exposed to ibuprofen.

Biomarkers	Ibuprofen concentrations (µg/L)			
	Control	0.1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L
CAT	131 ± 8.2 ^a	103 ± 7.6 ^a	125 ± 12.3 ^a	111 ± 12.1 ^a
GPx	37.2 ± 5.0 ^a	34.4 ± 2.5 ^a	37.4 ± 6.0 ^a	32.1 ± 6.1 ^a
GSH	0.3 ± 0.07 ^a	0.4 ± 0.08 ^a	0.3 ± 0.06 ^a	0.3 ± 0.05 ^a
GST	110 ± 7.9 ^a	100 ± 7.2 ^a	111 ± 12.1 ^a	101 ± 14.1 ^a
SOD	153 ± 9.5 ^a	119 ± 8.2 ^a	141 ± 12.9 ^a	156 ± 20.2 ^a
LPO	13.8 ± 0.8 ^a	12.4 ± 1.5 ^a	13.3 ± 1.2 ^a	11.3 ± 1.5 ^a
PCO	69.4 ± 10.6 ^a	77.8 ± 10.0 ^a	86.4 ± 12.2 ^a	82.6 ± 13.2 ^a
EROD	2.2 ± 0.5 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^a

Values are expressed as mean ± standard error of mean. Similar letters indicate no differences among groups ($p > 0.05$). ANOVA/Kruskal-Wallis, Newman-Keuls/Dunn's test. Catalase (CAT) = µmol/ min/mg protein, B-G=glutathione peroxidase (GPx) = nmol/min/mg protein, reduced glutathione (GSH) = µg/mg protein, glutathione S-transferase (GST) = nmol/min/mg protein, superoxide dismutase (SOD) = U/mg protein, lipid peroxidation (LPO) = nmol/mg protein, protein carbonylation (PCO)= pmol/mg protein, ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) = fmol/min/mg protein. CAT, SOD, PCO, EROD: Kruskal-Wallis/Dunn's test. GPx, LPO, GSH: ANOVA/Neuman-Keuls.

Table S2Biochemical biomarkers in the gills of *R. quelen* exposed to ibuprofen.

Biomarkers	Ibuprofen concentrations			
	Control	0.1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L
CAT	20.7 ± 1.1 ^a	23.8 ± 2.0 ^a	19.6 ± 1.3 ^a	21.4 ± 0.9 ^a
GPx	57.7 ± 2.9 ^a	69.1 ± 4.9 ^a	60.6 ± 4.9 ^a	62.0 ± 1.6 ^a
GSH	4.3 ± 0.2 ^a	5.0 ± 0.4 ^a	3.9 ± 0.3 ^a	4.5 ± 0.3 ^a
GST	56.0 ± 3.2 ^a	66.9 ± 5.4 ^a	61.6 ± 5.0 ^a	65.7 ± 5.4 ^a
SOD	258 ± 24.6 ^a	313 ± 23.4 ^a	264 ± 18.5 ^a	243 ± 8.1 ^a
LPO	19.5 ± 1.8 ^a	22.7 ± 2.0 ^a	20.2 ± 1.7 ^a	19.1 ± 1.0 ^a

Values are expressed as mean ± standard error of mean. Similar letters indicate no differences among groups ($p > 0.05$). ANOVA/Kruskal-Wallis, Newman-Keuls/Dunn's test. Catalase (CAT) = µmol/ min/mg protein, B-glutathione peroxidase (GPx) = nmol/min/mg protein, reduced glutathione (GSH) = µg/mg protein, glutathione S-transferase (GST) = nmol/min/mg protein, superoxide dismutase (SOD) = U/mg protein, lipid peroxidation (LPO) = nmol/mg protein. CAT, GST, GSH: ANOVA/Neuman-Keuls. GPx, SOD, LPO: Kruskal-Wallis/Dunn's test.

Table S3Genetic biomarkers in *R. quelen* exposed to ibuprofen

Tissues	Comet Assay			
	Control	0.1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L
Posterior kidney	70.0 ± 9.7 ^{ab}	33.4 ± 7.4 ^a	99.3 ± 24.4 ^{ab}	142 ± 33.8 ^b
Liver	67.6 ± 13.9 ^a	84.4 ± 19.6 ^a	84.1 ± 14.0 ^a	62.2 ± 19.3 ^a

DNA damage in posterior kidney and liver cells assessed by comet assay. Values are expressed as mean ± standard error of mean. Different letters indicates significant differences among groups ($p < 0.05$). Kruskal-Wallis, Dunn's test.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, in: *Methods in Enzimology*. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelnickova, L., Bartos, M., Di Tocco, F.C., Faggio, C., 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 102–108.
- Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1734–1739. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006
- Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A., 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 43, 597–603. doi:10.1021/es801845a
- Beyenbach, K.W., 2000. Renal handling of magnesium in fish: from whole animal to brush border membrane vesicles. *Front. Biosci.* 5, D712–D719. doi:10.2741/Beyenbach
- Bhandari, K., Venables, B., 2011. Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 153, 251–257. doi:10.1016/j.cbpc.2010.11.004
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Burke, D.M., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos* 2, 583–587.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136. doi:10.1139/f90-237
- Choe, K.P., Havird, J., Rose, R., Hyndman, K., Piermarini, P., Evans, D.H., 2006. COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. *J. Exp. Biol.* 209, 1696–1708. doi:10.1242/jeb.02198
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 105, 428–437. doi:10.1016/j.aquatox.2011.07.017
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 287–304. doi:10.3109/10408440903373590

- David, A., Pancharatna, K., 2009. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 390–395. doi:10.1016/j.etap.2009.01.002
- Donnachie, R.L., Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2016. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1021–1027. doi:10.1002/etc.3165
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3, 1–16. doi:10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., 2009. Osmotic and ionic regulation in fishes, in: *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. pp. 295–366. doi:10.1201/9780849380525.ch8
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
- Fent, K., Escher, C., Caminada, D., 2006. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reprod. Toxicol.* 22, 175–85. doi:10.1016/j.reprotox.2006.04.010
- Ferdous, F., Scott, T.R., 2015. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity. *Immunol. Lett.* 163, 32–39. doi:10.1016/j.imlet.2014.11.010
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., de Oliveira Ribeiro, C., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet. Mol. Biol.* 27, 103–107. doi:10.1590/S1415-47572004000100017
- Ferreira, A.P., 2014. Identification and quantification of ibuprofen in conventional wastewater treatment plants in Rio de Janeiro, Brazil, and their discharge to the aquatic environment. *J. Adv. Biol.* 4, 305–303. doi:10.24297/jab
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Köllner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 209–226. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.013
- Freire, C.A., Kinne, R.K., Kinne-Saffran, E., Beyenbach, K.W., 1996. Electrodiffusive transport of Mg across renal membrane vesicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol.* 270, 739–48.

- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45, 41–45. doi:10.1016/S0302-4598(98)00072-5
- Ghelfi, A., Ribas, J.L.C., Guiloski, I.C., Bettim, F.L., Piancini, L.D.S., Cestari, M.M., Pereira, A.J., Sasaki, G.L., Silva De Assis, H.C., 2016. Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 49–54. doi:10.1007/s00128-015-1693-3
- Gilmour, K.M., Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 212, 1647–1661. doi:10.1242/jeb.029181
- Gomes, L., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179–185. doi:10.1590/S0103-84782000000100029
- Gómez-Abellán, V., Sepulcre, M.P., 2016. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. *Mol. Immunol.* 69, 139–145. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.022
- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 391–9. doi:10.3109/01480545.2013.870191
- Gravel, A., Wilson, J.M., Pedro, D.F.N., Vijayan, M.M., 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 481–490. doi:10.1016/j.cbpc.2008.11.002
- Guiloski, I.C., Piancin, L.D.S., Dagostin, A.C., Calado, S.L. de M., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2017a. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 291–300. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.053
- Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Pereira, L. da S., Neves, A.P.P., Silva de Assis, H.C., 2015. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 204–211. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.11.020
- Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Cirio, S.M., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., da Cunha, C., Silva de Assis, H.C., 2017b. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 53, 111–120. doi:10.1016/j.etap.2017.05.005
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. *J. Nutr.* 104, 747–753.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J.S., Zhang, X., Giesy, J.P., 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia*

- magna and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–64. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.013
- Hayashi, Y., Heckmann, L.-H., Callaghan, A., Sibly, R.M., 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 17, 246–51. doi:10.1007/s10646-008-0191-3
- Heddle, J.A., 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 18, 187–190. doi:10.1016/0027-5107(73)90035-3
- Henry, R.P., 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro, in: *The Carbonic Anhydrases*. pp. 119–125. doi:10.1007/978-1-4899-0750-9_8
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., Dublán-García, O., 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5157–5166. doi:10.1007/s11356-013-2477-0
- Jeffries, K.M., Brander, S.M., Britton, M.T., Fangue, N.A., Connon, R.E., 2015. Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17397–17413. doi:10.1007/s11356-015-4227-y
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N
- Jones, H.S., Trollope, H.T., Hutchinson, T.H., Panter, G.H., Chipman, J.K., 2012. Metabolism of ibuprofen in zebrafish larvae. *Xenobiotica* 42, 1069–1075. doi:10.3109/00498254.2012.684410
- Jozwiak-Bebenista, M., Nowak, J.Z., 2014. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 71, 11–23.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. *Chemosphere* 77, 518–525. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.041
- Larsson, D.G.J., de Pedro, C., Paxeus, N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 148, 751–5. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.07.008
- Levine, R.L., Williams, J. A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, in: *Methods in Enzymology*. pp. 346–357.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Erroi, E., Schettino, T., 2012. Carbonic

- anhydrase as pollution biomarker: An ancient enzyme with a new use. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 3965–3977. doi:10.3390/ijerph9113965
- Marshall, W.S., Grosell, M., 2006. Ion transport, osmoregulation, and acid–base balance, in: *The Physiology of Fishes*. pp. 179–214.
- Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R., 2010. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2176–2182. doi:10.1021/es903702m
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Rabitto, I.S., da Silva, C.A., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013a. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 108–116. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.002
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., De Oliveira Ribeiro, C.A., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013b. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.* 126, 17–29. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.007
- Morthorst, J.E., Lister, A., Bjerregaard, P., Der Kraak, G. Van, 2013. Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 157, 251–257. doi:10.1016/j.cbpc.2012.12.001
- Nagasawa, T., Somamoto, T., Nakao, M., 2015. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 52, 107–111. doi:10.1016/j.dci.2015.05.002
- Pamplona, J.H., Oba, E.T., da Silva, T.A., Ramos, L.P., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., Zampronio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2011. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 342–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.09.010
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1586–1594. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.025
- Pereira, L.S., Ribas, J.L.C., Vicari, T., Silva, S.B., Stival, J., Baldan, A.P., Domingos, F.X.V., Grassi, M.T., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2016. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130, 29–36. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.046
- Polo, A. de, Scrimshaw, M.D., 2012. Challenges for the development of a biotic ligand model

- predicting copper toxicity in estuaries and seas. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 230–238. doi:10.1002/etc.1705
- Prodocimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in agglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 262, 243–253. doi:10.1016/S0022-0981(01)00293-3
- Prodocimo, V., Sinzker, R.C., Strey, L., Freire, C.A., 2015. Physiological biomarkers in a resident and a non-resident estuarine teleosts species: a comparison between fish from an industrially impacted site and a non-impacted site. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 48, 117–134. doi:10.1080/10236244.2015.1018022
- Quinn, B., Schmidt, W., Rourke, K.O., Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84, 657–663. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.033
- Ribas, J.L.C., da Silva, C.A., de Andrade, L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Trindade, E.S., Zamprônio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2014. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 296–303. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.009
- Ribas, J.L.C., Zamprônio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2016. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 975–982. doi:10.1002/etc.3240
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1530–1536. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.032
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 461–462, 302–16. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.077
- Saravanan, M., Devi, K.U., Malarvizhi, A., Ramesh, M., 2012. Effects of ibuprofen on hematological , biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp , *Cirrhinus mrigala*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 14–22. doi:10.1016/j.etap.2012.02.005
- Saravanan, M., Karthika, S., Malarvizhi, A., Ramesh, M., 2011. Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *J. Hazard. Mater.* 195, 188–194. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.029

- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 31, 9–15. doi:10.1016/0165-1161(75)90058-8
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 205, 192–205. doi:10.1016/0003-2697(68)90092-4
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Souza-Bastos, L.R., Freire, C.A., 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289, 167–174. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.01.007
- Tavares-Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R., 2002. Características hematológicas de teleósteos brasiliros. IV. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural* 32, 693–698. doi:10.1590/S0103-84782002000400024
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto. SP.
- Tavares-Dias, M., Tenani, R.A., Gioli, L.D., Faustino, C.D., 1999. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.* 16, 423–431. doi:10.1590/S0101-81751999000200008
- Vandenberg, L.N., 2014. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: Bisphenol a as a case study. *Dose-Response* 12, 259–276. doi:10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W. V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. doi:10.1210/er.2011-1050
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 122, 121–129. doi:10.1016/S0742-8413(98)10094-4
- Voilley, N., Weille, J. De, Mamet, J., Lazdunski, M., 2001. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci.* 21, 8026–8033.
- Welshons, W. V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S., 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ. Health Perspect.* 111, 994–1006. doi:10.1289/ehp.5494
- Wilkinson, J.L., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2016. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of

- environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 336–381. doi:10.1080/10643389.2015.1096876
- Xia, L., Zheng, L., Zhou, J.L., 2017. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 182, 416–425. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.054
- Yeh, H.C., Wang, L.H., 2006. Profiling of prostanoids in zebrafish embryonic development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 75, 397–402. doi:10.1016/j.plefa.2006.08.001
- Zou, J., Neumann, N.F., Holland, J.W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C.J., Rowley, A. F., 1999. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochem. J.* 340, 153–159.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO DESREGULADOR ENDÓCRINO DO IBUPROFENO EM PEIXES MACHOS *Rhamdia quelen*

Artigo: Ibuprofen down-regulates brain aromatase expression (*cyp19a1b*) from male fish
Rhamdia quelen

O artigo está nas normas da revista Ecotoxicology and Environmental Safety para submissão.

Ibuprofen down-regulates brain aromatase expression (*cyp19a1b*) from male fish *Rhamdia quelen*

Francielle Tatiana Mathias, Geonildo Rodrigo Disner, Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Marta Margarete Cestari, Helena Cristina Silva de Assis

Abstract

Pharmaceuticals are considered emerging contaminants and have been found in aquatic environment. These contaminants can act as endocrine disruptors in fish, causing damage to reproduction. The aim of this study was evaluate the potential endocrine disrupting effect of ibuprofen in freshwater fish *Rhamdia quelen*. The fish was exposed to environmentally relevant concentrations of ibuprofen 0.1, 1.0 e 10 µg/L. After 14 days the fish were anesthetized and euthanized by medular section. The hypothalamus was used to expression of brain aromatase (*cyp19a1b*) and the gonad for histopathological, biochemical and genotoxic analyses. The results showed that ibuprofen down-regulated the expression of hypothalamus aromatase (*cyp19a1b*) in a concentration-dependent manner. Testosterone and estradiol levels were not changed. In gonad, ibuprofen did not cause oxidative stress, but decreased the GST activity at 10 µg/L. Histopathological alterations were not observed and the gonadosomatic index was no changed. These results showed that the ibuprofen has a potential as endocrine disrupting compound, since down-regulation observed in brain aromatase expression can lead to disruption of estrogen-related biological processes.

Keywords: NSAIDs, brain aromatase, endocrine disruption, pharmaceuticals.

1 Introduction

Due to high consumption and insufficient removal in sewage treatment plants, human and veterinary pharmaceuticals have been detected in aquatic ecosystems. Pharmaceuticals are considered emerging contaminants, since they are biologically active molecules, potentially dangerous for aquatic organisms and for ecosystems (Ferreira, 2014). Several studies have demonstrated the presence of pharmaceuticals in surface waters (Fent et al., 2006; Kim et al., 2009), in effluents (Hofman-Caris et al., 2017), in seawater (Lolić et al., 2015), in groundwater (Dougherty et al., 2010) and drinking water (Sun et al., 2015).

Pharmaceuticals are found in the aquatic environment in the range of $\mu\text{g/L}$ and ng/L . Generally they do not show acute toxicity but have a significant cumulative effect on the metabolism of non-target organisms (Ferreira, 2014). In aquatic ecosystem, pharmaceuticals may cause toxicity to non-target organisms at different trophic levels, including algae, fish, zooplankton and other invertebrates (Donnachie et al., 2016; Nikolaou et al., 2007). Due to fish are in direct contact with water, they are especially susceptible to absorption and effects of these contaminants (Corcoran; Winter; Tyler, 2010).

Among the therapeutic classes present in the aquatic environment, the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) cause concern about environmental impact. They are widely used by the population and are often detected in water bodies (Sousa et al., 2018). Ibuprofen belongs to the NSAIDs class and is used as an analgesic, antipyretic and anti-inflammatory (Donnachie et al., 2016). It acts as a non-selective inhibitor of cyclooxygenase (COX) 1 and 2, preventing the formation of pro-inflammatory mediators such as the prostaglandins by the arachidonic acid cascade (Gravel et al., 2009). It has been detected in surface waters of several countries including the United States, Canada, Germany, Spain, Switzerland and India, in concentrations ranged from 0.001 to 117 $\mu\text{g/L}$ (Ebele et al., 2017).

Several studies have demonstrated the presence of the two COX isoforms present in humans, in different fish species, including *Danio rerio* (Ji et al., 2013; Morthorst et al., 2013; Xia et al., 2017), *Pimephales promelas* (Patel et al., 2016), *Oryzias latipes* (Flippin et al., 2007), *Oncorhynchus mykiss* (Cuklev et al., 2011; Mehinto et al., 2010) and *Fundulus heteroclitus* (Choe et al., 2006). A decrease in prostaglandins was also observed in fish exposed to NSAIDs (Bhandari and Venables, 2011; David et al., 2017; Morthorst et al., 2013; Patel et al., 2016).

In teleosts, prostaglandins play important physiological roles, including actions on reproduction (Hayashi et al., 2008). They are involved in processes such as oocyte maturation, ovulation (Lister and Van Der Kraak, 2008), regulation of gonadal steroidogenesis (Van Der Kraak and Chang, 1990; Wade and Van Der Kraak, 1993) and in the induction of male and female sexual behavior (Sorensen and Goetz, 1993). NSAIDs cause decrease in prostaglandins and has been shown to cause endocrine disrupting effects in fish (Gröner et al., 2017; Guiloski et al., 2017b; Martinović-Weigelt et al., 2017).

The World Health Organization (WHO) defined endocrine disruptors as exogenous substance that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an organism, its progeny or sub-population (Bergman et al., 2012). Several studies have been demonstrated the effects of ibuprofen on reproductive parameters in aquatic

organisms. In *Oryzias latipes* exposed for six weeks, ibuprofen (1-100 µg/L) increased the number of eggs per reproductive event and decreased the number of spawns per week (Flippin et al., 2007). In the same species, was observed presence of plasma vitellogenin in male fish (1000 µg/L), more eggs per brood in females (10 and 100 µg/L) and delay in hatching eggs (0.1 µg/L) (Han et al., 2010). The crustacean *Daphnia magna* exposed for 10 days at concentrations of 0, 20, 40 and 80 mg/L, produced fewer offspring in higher concentrations and caused a delay in age for first reproduction at all concentrations evaluated (Hayashi et al., 2008).

Although there are studies demonstrating the potential endocrine disrupting effect of ibuprofen, data about effects on neotropical fish are scarce. It is known that the toxic effects of a contaminant may vary according to species (Milan et al., 2013). In addition, the detection of ibuprofen in water bodies has a worldwide occurrence, including Brazil (Ferreira, 2014). Therefore, it is important to evaluate the effects of this drug on fish from different regions of the world. *Rhamdia quelen* is a species of freshwater neotropical, found from the center of Argentina to the south of Mexico. It is of great economic importance in Brazil, since it is well adapted to different environments and is widely used in pisciculture, with good acceptance in the consumer market (Bombardelli et al., 2006). Furthermore, several authors have used the species in the evaluation of environmental contaminants as a study model (Becker et al., 2009; Ghelfi et al., 2016; Guiloski et al., 2017a, 2017b; Mela et al., 2013; Pamplona et al., 2011; Pereira et al., 2016).

The aim of this study was to investigate the potential endocrine disruptor effect of ibuprofen on fish *Rhamdia quelen*, in concentrations found in the aquatic environment. For this purpose, some parameters related to fish reproduction were evaluated including the gene expression of brain aromatase (*cyp19a1b*), testosterone and estradiol plasma levels, gonadosomatic index, gonad histopathology, biochemical and genotoxic biomarkers.

2 Material and Methods

2.1 Experimental design

Adult male fish of the species *R. quelen* were obtained in pisciculture in the metropolitan region of Curitiba, Paraná, Brazil. The fish were acclimated in a laboratory for 30 days using glass aquarium (120 L capacity). After the acclimation period they were divided into 4 groups (n=10 per group), three groups exposed to nominal ibuprofen

concentrations 0.1, 1 and 10 µg/L (Ibuprofen, I4883-1G, CAS number 15687-27-1, powder, purity \geq 98%, Sigma Aldrich) and one control group (solvent acetone). The bioassay had two replicates per group (n= 5 fish/aquarium). The nominal concentration 1 µg/L was selected based on concentrations found in freshwaters environment (Corcoran et al., 2010), and concentrations ten times lower and ten times higher were also tested. Ibuprofen was diluted in water to obtain a stock solution 100mg/L, with addition of acetone (6 ml/L). The stock solution was added in the appropriate volume to the aquarium water to obtain the final tested concentrations. The exposure was semi-static, and every 24 hours half of the water was changed and ibuprofen was replaced to keep the nominal concentrations. This procedure was based on ibuprofen degradation experiment (Mathias et al., 2018).

After 14 days of exposure, the animals were anesthetized with benzocaine 1%, the blood was collected through a caudal vein puncture and fish were euthanized by spinal cord section. Fish were weighed and total length was measured. The brain was dissected to separate the hypothalamus. The hypothalamus and the gonads were stored at -80°C for posterior analyses.

During the bioassay the animals were maintained in filtered water, with photoperiod of 12 hours, temperature 23 ± 2 °C, constant aeration and were fed with commercial ration (MP 31, Primor, Brazil) once a day. Water parameters, including, total ammonia, toxic ammonia, dissolved oxygen, alkalinity, pH and temperature were monitored during the bioassay. The project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Paraná, under No. 788/2014.

2.2 RT-qPCR: Brain aromatase (*cyp19a1b*) expression

The extraction of the hypothalamic RNA was performed with the mini kit (Qiagen). RNA extracted was eluted in RNase-free water and 2 µg was treated with DNase I (Invitrogen). Using Reverse Transcription System (Promega), 1 µg of RNA treated with DNase was reverse transcribed into cDNA with 1 µL (500 ng/µL) of Oligo(dT)₁₅ primer, according to manufacturer's instruction. The reaction was incubated at 20 °C for 10 min, 45 °C for 45 min and 95 °C for 5 min. The specific cDNA for *cyp19a1b* and for reference genes, β -actin and elongation factor-1 α , was amplified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), using specific pairs of primers described in Silva de Assis et al. (2018). For the amplification reaction was used (separated for each gene), Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems), 40 ng of cDNA (RNA retrotranscribed) and 0.8 µM of each primer and

in a final volume of 25 μ L. Cycling conditions were 95° C for 15 min, followed by 40 cycles of 95° c for 15 s, 59° C for 15 s, 72° C for 40 s, followed by the dissociation curve to confirm the primer specificity.

To determine relative abundance of the genes was used the method of the relative standard curve (Applied Biosystems, 1997). Standard curves were obtained from the pooled of RNA serially diluted, from hypothalamus of the control group. The qPCR analysis also included a non-template control (NTC) and a no reverse transcription control (RTC) to confirm the absence of DNA in the RNA samples. The analysis was performed in a StepOne plus equipment (Applied Biosystems) and each sample, including standard curve, NTC and RTC, was run in triplicate in 96 well-plates. Lastly, it was calculated the ratio between the *cyp19a1b* abundance and the arithmetic mean of the reference genes abundance for each sample.

2.3 Hormonal analyses

Testosterone and estradiol levels were measured in plasma. Blood was centrifugated at 2.000 x g for 5 minutes and plasma kept at -80° C until analysis. The concentrations were measured with microparticle enzyme immunoassay (AxSYM Abbott, Abbott Laboratories).

2.4 Histopathological biomarker and gonadossomatic index (GSI)

Fragments of gonad were fixed in ALFAC (ethanol 80%, formaldehyde 40%, and acetic acid 100%), dehydrated in a graded series of ethanol, diaphanized with xylol and embedded in Paraplast Plus resin (Sigma). Sections of 7 μ m were stained in Hematoxilin/Eosin and observed in a photomicroscope to determine a lesion index for each organ (Bernet et al., 1999). The lesion index was calculated as: Lesion Index = Σ lesion score x importance factor. The lesion score was determined according to the extension of each lesion in the tissue and the importance factor corresponds to the pathological importance of the lesion described by (Bernet et al. (1999).

Gonadossomatic index (GSI) was determined with following formula:

$$\text{GSI} = (\text{Gonad weight} / \text{Whole body weight}) \times 100$$

2.5 Biochemical biomarkers

Biochemical biomarkers were carried out in gonads. The tissue was homogenized at 1:10 w/v in phosphate buffer (0.1M, pH 7.0), and centrifuged $15.000 \times g$ at 4°C for 30 minutes. The supernatant was used to determine enzyme activity. The activities of enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH) concentration and lipid peroxidation (LPO) were measured.

The CAT activity was measured according to Aebi (1984), based in the decreasing the absorbance of hydrogen peroxide. In microplate were added 5 μL of the diluted sample and 295 μL of reaction solution (20mM H_2O_2 , 50mM Tris-base, 0.25mM EDTA, pH 8.0). The absorbance decrease was measured at 240 nm.

The GPx activity was performed according to Hafeman; Sunde; Hoekstra (1974). This method is based on the reduction of GSSG, catalyzed by glutathione reductase in the presence of NADPH. For reaction, 10 μL of the pure supernatant was added to the microplate, followed by 130 μL of reaction solution (3.08mM of sodium azide; 0.308mM of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH); 1.54 U/mL of glutathione reductase and 3.08mM of reduced glutathione in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0) and after 2 minutes, 60 μL of 1.5mM H_2O_2 was added. The absorbance was measured at 340 nm.

Analysis of the GST activity was based on the method of Keen; Habig; Jakoby (1976). The method used CDNB (1-chloro-2,4-nitrobenzene) and GSH such substrate. On the microplate, were added 20 μL of the diluted supernatant and 180 μL of the reaction solution (3 mM GSH, 3 mM CDNB in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5). The increase in the absorbance was measured at 340 nm.

The SOD activity was evaluated according to the method of Gao et al. (1998). The method is based in ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of pyrogallol. In microtube was added 40 μL of diluted supernatant and 885 μL of buffer (1M Tris base, 5 mM EDTA, pH 8.0). After that was added 50 μL of 15 mM pyrogallol and incubated for 30 minutes. The reaction was stopped with 25 μL of 1 N HCl. In microplate was added 300 μL and the reading was performed at 440 nm.

The reduced glutathione levels (GSH) were evaluated according to Sedlak; Lindsay (1968). For the analyze, 50 μL of sobrenadant (after protein precipitation with 50% trichloroacetic acid (TCA) and centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C) was added in microplate. Next, was added 230 μL of buffer (0.4 M Tris-base, pH 8.9) and 20 μL of 2.5 mM DTNB diluted in methanol. Determination of the GSH concentration was performed by comparison with a standard GSH curve. The reading was performed at 415 nm.

Lipid peroxidation (LPO) was analyzed by the method of Jiang; Hunt; Wolff (1992). The supernatant was diluted in methanol (1:1 v/v) and centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes at 4 ° C. Then, 100 µL of the supernatant was added to 900 µL reaction solution (0.1mM xylanol orange, 25 mM H₂SO₄, 4 mM butylated hydroxytoluene (BHT), 0.25 mM ammoniacal ferrous sulfate (FeSO₄NH₄)) and incubated for 30 minutes. In the microplate, 300 µL of the incubated solution was added and the absorbance was measured at 570 nm.

2.6 Biomarker for genotoxicity

The comet assay (alkaline version) for the gonads was analyzed according to Singh et al. (1988) with minor modifications by Ferraro et al. (2004). The cellular homogenate was resuspended in 120µL of 0.5% low-melting point agarose and placed on a microscope slide pre-coated with normal agarose 1.5%. The slides were incubated in a lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 10; 1% Triton X-100, 1% *N*-lauryl-sarcocinate and 10% DMSO) under refrigeration for 24 h. Before electrophoresis, slides were kept for 25 min in an alkaline buffer (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH > 13), to unwind the DNA. Electrophoresis was performed for 25 min at 1 V/cm (25 V; 300 mA) and the slides were neutralized for 15 min with a buffer (0.4 M Tris, pH 7.4). They were fixed with absolute ethanol for 5 minutes and stained with ethidium bromide. Comets were scored using a Zeiss epifluorescence microscope. For each fish, 100 cells were analyzed visually and classified from 1 to 4, based in DNA fragmentation in the nucleus. Classes correspond to damages as follows, class 0 (no visible damage), class 1 (little damage), class 2 (medium damage), class 3 (extensive damage) and 4 (maximally damaged). The score was calculated by multiplying the number of nuclei found in a class times the class number.

2.7 Statistical analysis

The data were evaluated by the Kolmogorov–Smirnov normality test. In the case of parametric data, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Neuman-Keuls test. For non-parametric data was used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Significance was considered when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Experimental design

No mortality was observed during the bioassay. The weight of the animals was 121.5 ± 77.0 g and the total length was 23.5 ± 4.5 cm. The water parameters were monitored during the bioassay and there were no differences among the groups (Kruskal-Wallis/Dunn's test). The values found were: total ammonia (0.25-3.5 mg/L), toxic ammonia (0.001-0.013 mg/L), dissolved oxygen (8.0-11.0 mg/L), pH (6.6 – 6.8 units), alkalinity (50-150 mg/L CaCO_3) and temperature ($22.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$).

3.2 Brain aromatase (*cyp19a1b*) expression

Ibuprofen down-regulates brain aromatase expression in the hypothalamus of the fish in all exposed groups compared to control (Fig. 1). The negative controls NTC and RTC confirmed the absence of DNA in the RNA samples.

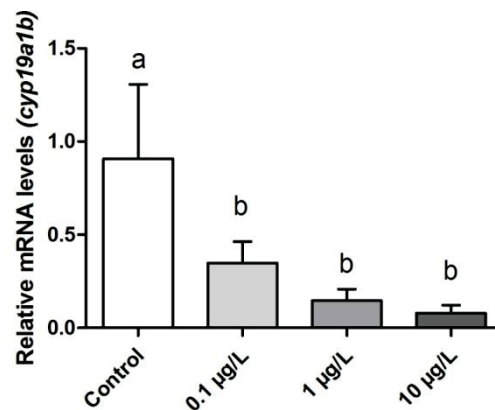


Fig 1. Relative expression of brain aromatase (*cyp19a1b*) in hypothalamus of *R. quelen* exposed to ibuprofen. Values are expressed as means \pm standard error of mean. Different letters indicate significant differences among groups ($p < 0.05$). ANOVA/ Newman-Keuls test.

3.3 Hormonal analyses

Testosterone and estradiol levels in plasma showed no statistical differences in groups exposed to ibuprofen compared to the control group (Figure 2).

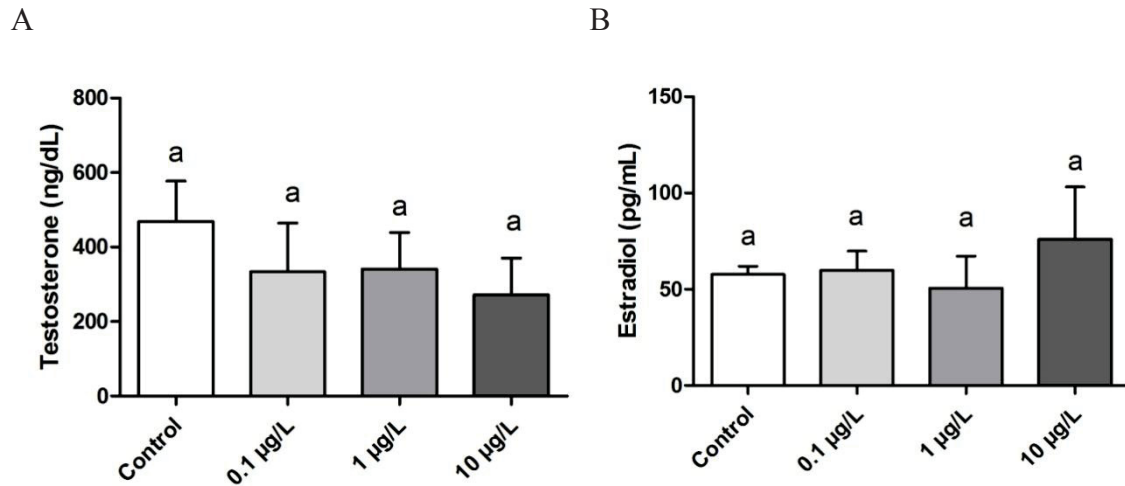


Fig. 2. Hormonal plasma concentrations in *Rhamdia quelen* exposed to ibuprofen. A. Testosterone B. Estradiol. Values are expressed as means \pm standard error of mean. Similar letters indicate no differences among groups ($p > 0.05$). ANOVA/Neuman-Keuls.

3.4 Histopathological biomarker and GSI

There were no differences in the lesion index in the exposed groups compared to the control group. It was also not observed changes in the GSI compared to the control group (Table 1).

Table 1. Histopathology and GSI in gonad of *R. quelen* exposed to ibuprofen.

	Ibuprofen concentrations			
	Control	0.1µg/L	1 µg/L	10 µg/L
Lesion index	1.4± 0.9 ^a	6.0± 2.0 ^a	6.3± 2.7 ^a	4.9 ± 1.8 ^a
GSI	0.8 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.2 ^a	0.5 ± 0.07 ^a	1.1 ± 0.2 ^a

Values are expressed as mean \pm standard error of mean. Similar letters indicate no differences among groups ($p > 0.05$). Kruskal-Wallis, Dunn's test.

3.5 Biochemical biomarkers

The CAT, SOD and GPx activities, GSH concentration and LPO in gonads, were not altered in groups exposed to ibuprofen compared to control group. However, ibuprofen decreased the GST activity in the group exposed to 10 µg/L when compared to control group (Table 2).

Table 2. Biochemical biomarkers in the gonad of *R. quelen* exposed to ibuprofen.

Biomarkers	Ibuprofen concentrations (µg/L)			
	Control	0.1µg/L	1 µg/L	10 µg/L
CAT	15.9 ± 1.2 ^a	14.9 ± 1.1 ^a	14.9 ± 0.7 ^a	12.3 ± 1.9 ^a
GPx	96.1 ± 6.0 ^a	90.5 ± 3.4 ^a	85.0 ± 3.4 ^a	82.0 ± 3.4 ^a
GSH	7.1 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.6 ^a	4.7 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.8 ^a
GST	66.3 ± 2.4 ^a	59.1 ± 3.5 ^{ab}	62.4 ± 3.6 ^a	51.5 ± 2.6 ^b
SOD	230.6 ± 11.5 ^a	237.2 ± 9.5 ^a	240.2 ± 13.7 ^a	225.1 ± 11.0 ^a
LPO	62.4 ± 4.4 ^a	46.1 ± 5.6 ^a	50.5 ± 6.4 ^a	41.0 ± 5.6 ^a

Values are expressed as mean ± standard error of mean. Different letters indicates significant differences among groups (p<0.05). Catalase (CAT) = µmol/ min/mg protein, B-G=glutathione peroxidase (GPx) = nmol/min/mg protein, reduced glutathione (GSH) = µg/mg protein, glutathione S-transferase (GST) = nmol/min/mg protein, superoxide dismutase (SOD) = U/mg protein, lipid peroxidation (LPO) = nmol/mg protein. CAT, GSH, GST, SOD, LPO: ANOVA, Newman-Keuls. GPx: Kruskal-Wallis, Dunn's test.

3.6 Genotoxicity biomarker

The comet assay in gonads showed no significant differences among the exposed groups to ibuprofen and the control group. The mean and standard error of mean of DNA damage were: control group (111.3 ± 16.3), 0.1 µg/L (113.3 ± 30.2), 1 µg/L (130.7 ± 23.9) and 10 µg/L (191.0 ± 35.6).

4 Discussion

The evaluation of brain aromatase expression in hypothalamus of *Rhamdia quelen* demonstrated that ibuprofen down-regulated the expression of the enzyme in a concentration-dependent manner. Brain aromatase (*cyp19a1b*) is the major enzyme responsible for converting androgens (C19) to estrogens (C18), such as estradiol and estrone, in the teleost brain (Breton et al., 2015). In *Rhamdia quelen* brain, the hypothalamus and pituitary have the highest expression levels of *cyp19a1b* (Silva de Assis et al., 2018). A high level of aromatase expression in the teleost brain is required due to the role of estradiol in the regulation of neurogenesis and brain repair (Cheshenko et al., 2008; Diotel et al., 2018). Besides that, the enzyme is involved with neuroendocrine regulation, sexual behavior and sexual differentiation (Diotel et al., 2010) and it is considered to be a potential endocrine disruptor

target because modulation of its expression and function may lead to disruption of estrogen-related biological processes (Cheshenko et al., 2008).

The action mechanism of the NSAIDs can be related with down regulation of aromatase as observed in our study. COX-inhibitors may affect the activity of the aromatase through different signaling pathways (Komar, 2005; Su et al., 2007). The Prostaglandin E₂ (PGE₂), the major product of cyclooxygenase-2 (COX-2), stimulates aromatase gene expression via protein kinase A and C signaling pathways (Su et al., 2007) and their reduction may impair expression of aromatase. Besides that, NSAIDs are able to activate PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Komar, 2005), since COX-2 contains a response element for these receptors (Meade et al., 1999). PPAR γ activated can inhibit the expression of aromatase by disrupting the interaction of NF- κ B with the aromatase promoter II (Fan et al., 2005). Milan et al. (2013), demonstrated that the ibuprofen causes up regulation in genes of the PPARs signaling pathway. Thus, the down regulation in brain aromatase expression can be related with decreased in prostaglandin in *Rhamdia quelen* or a direct effect of the NSAIDs on PPARs, resulting in decrease in expression of the enzyme.

Others studies that investigated the effect of ibuprofen on brain aromatase showed a different result when compared to our study. Evaluation of the effect of ibuprofen *in vitro* demonstrated increase in the activity of the aromatase enzyme at concentrations of 0.2 and 2 mg/L (HAN et al., 2010), but the authors evaluated higher concentrations compared to our study. An *in vivo* study showed an increase in expression of brain and gonadal aromatase in males and females (*Danio rerio*) exposed to ibuprofen for 21 days at a concentration of 10 μ g/L (Ji et al., 2013). However, the authors discuss that based on the mechanism of action of the drug the expected effect would be the decrease in the expression of aromatase, as was observed in our study.

It was not observed hormonal changes in testosterone and estradiol levels in fish exposed to ibuprofen. The hormones were quantified in plasma and they don't have a direct link with the local production the estrogen in brain. But, the brain aromatase acts on the neuroendocrine regulation, since the estrogen levels (Vosges et al., 2012, 2010) and aromatizable androgen testosterone (Breton and Sambroni, 1996) present in the brain may increase the release of the gonadotrophin releasing hormones (GnRH). It is possible that 14 days of exposure to ibuprofen were not sufficient to disrupt the reproductive axis and cause changes in plasma testosterone and estradiol levels. However, the down regulation in brain aromatase expression probably will alter local estrogen levels and compromise functions of

estrogen such as neurogenesis, brain repair and sexual behavior (Cheshenko et al., 2008, Breton et al., 2015).

In the gonad was not observed histopathological changes or alterations in GSI, which was expected due to the absence of hormonal changes. Studies with NSAIDs showed that hormonal changes are linked with alterations in histology and in GSI for male fish. Similar to our result, *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac (0.2, 2 and 20 µg/L) not altered GSI or histology of testes, as well as did not cause changes in testosterone and estradiol (Guiloski et al., 2017a). In the other way, male *Rhamdia quelen* exposed to 2.5 µg/L of paracetamol demonstrated an inhibition of spermatogenesis, related with an anti-androgenic effect of the drug (Guiloski et al., 2017b).

Biochemical biomarkers in gonad showed that ibuprofen decreased GST activity in the group exposed to highest tested concentration, while the other enzymes CAT, GPx and SOD, GSH concentration and LPO were not altered. The NSAID diclofenac also decreased GST activity in gonad of the *Rhamdia quelen* exposed to concentration of the 0.2 µg/L (Guiloski et al., 2017a). GST is an important enzyme for conjugation and metabolism of endogenous compounds (Quinn et al., 2011) and present a key role in the detoxification of ibuprofen (Milan et al., 2013). The decreased in their activity may increase the half life of the drug in the gonad, increasing their effects. Alterations in antioxidant system and oxidative stress caused by NSAIDs was observed in some fish species in liver (Islas-Flores et al., 2014; Pamplona et al., 2011; Pandey et al., 2017), gills (Islas-Flores et al., 2014) and posterior kidney (Ghelfi et al., 2016; Mathias et al., 2018). However, in gonads there are few studies. It is possible that that antioxidant defenses in others organs should have prevented oxidative stress in the gonads.

In our study, ibuprofen did not damage DNA in gonad in 14 days of exposure. Genotoxicity was observed for bivalve *Dreissena polymorpha* exposed to concentrations 0.2, 2 and 8 µg/L of ibuprofen (Parolini et al., 2011) and in *Daphnia magna* exposed to 2.9mg/L in acute exposure (Gómez-Oliván et al., 2014). The damage to DNA was correlated with increase in antioxidant system and oxidative stress, respectively. Rocco et al. (2010) evaluated the effects of ibuprofen on *Danio rerio* at a concentration of 66.4 ng/µL and no damage was observed after 14 days of exposure, similar to our results. Others NSAIDs showed cause genotoxicity in blood of *Cyprinus carpio* (Sanjuan-reyes et al., 2015) and in liver of *Oreochromis niloticus* (Pandey et al., 2017), but in our knowledge there are no studies evaluating genotoxicity in gonad of fish exposed to pharmaceuticals.

5 Conclusion

Ibuprofen down regulated brain aromatase expression in hypothalamus in a concentration-dependent manner. Therefore it was not observed alterations in hormonal levels, in GSI and in histopathological and genotoxic biomarkers. The drug decreased GST activity at the highest concentration tested that can affected biotransformation system in gonad. These results showed that the ibuprofen has a potential as endocrine disrupting compound, since down-regulation observed in brain aromatase expression can lead to disruption of estrogen-related biological processes.

Acknowledgements

The authors thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology) for financial support.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, in: Methods in Enzimology. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Applied Biosystems, 1997. User Bulletin # 2 ABI P RISM 7700 Sequence Detection System.
- Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1734–1739. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006
- Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, R.T., 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals. UNEP, WHO. doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22, 25–34. doi:10.1046/j.1365-2761.1999.00134.
- Bhandari, K., Venables, B., 2011. Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. Comp. Biochem. Physiol. , Part C 153, 251–257. doi:10.1016/j.cbpc.2010.11.004
- Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A., Syperreck, M.A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Rev. Bras. Zootec. 35, 1251–1257. doi:10.1590/S1516-35982006000500001

- Breton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid Activation of the brain–pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 101, 155–164. doi: 10.1006/gcen.1996.0017
- Breton, T.S., DiMaggio, M.A., Sower, S.A., Berlinsky, D.L., 2015. Brain aromatase (cyp19a1b) and gonadotropin releasing hormone (gnrh2 and gnrh3) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (*Centropristis striata*). Comp. Biochem. Physiol. Part A 181, 45–53. doi:10.1016/j.cbpa.2014.11.020
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 155, 31–62. doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.005
- Choe, K.P., Havird, J., Rose, R., Hyndman, K., Piermarini, P., Evans, D.H., 2006. COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. J. Exp. Biol. 209, 1696–1708. doi:10.1242/jeb.02198
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. Crit. Rev. Toxicol. 40, 287–304. doi:10.3109/10408440903373590
- Cuklev, F., Kristiansson, E., Fick, J., Asker, N., Förlin, L., Larsson, D.G.J., 2011. Diclofenac in fish: Blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. Environ. Toxicol. Chem. 30, 2126–2134. doi:10.1002/etc.599
- David, A., Lange, A., Abdul-Sada, A., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2017. Disruption of the prostaglandin metabolome and characterization of the pharmaceutical exposome in fish exposed to wastewater treatment works effluent as revealed by nanoflow-nanospray mass spectrometry-based metabolomics. Environ. Sci. Technol. 51, 616–624. doi:10.1021/acs.est.6b04365
- Diotel, N., Charlier, T.D., Lefebvre d’Hellencourt, C., Couret, D., Trudeau, V.L., Nicolau, J.C., Meilhac, O., Kah, O., Pellegrini, E., 2018. Steroid transport, local synthesis, and signaling within the brain: Roles in neurogenesis, neuroprotection, and sexual behaviors. Front. Neurosci. 12, 1–27. doi:10.3389/fnins.2018.00084
- Donnachie, R.L., Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2016. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1021–1027. doi:10.1002/etc.3165
- Dougherty, J.A., Swarzenski, P.W., Dinicola, R.S., Reinhard, M., 2010. Occurrence of Herbicides and Pharmaceutical and Personal Care Products in Surface Water and Groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. J. Environ. Qual. 39, 1173. doi:10.2134/jeq2009.0189
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerg. Contam. 3, 1–16.

doi:10.1016/j.emcon.2016.12.004

- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Mu, Y.-M., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., Nawata, H., 2005. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ and Retinoid X Receptor Inhibits Aromatase Transcription via Nuclear Factor- κ B. *Endocrinology* 146, 85–92. doi:10.1210/en.2004-1046
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., de Oliveira Ribeiro, C., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet. Mol. Biol.* 27, 103–107. doi:10.1590/S1415-47572004000100017
- Ferreira, A.P., 2014. Identification and quantification of ibuprofen in conventional wastewater treatment plants in Rio de Janeiro, Brazil, and their discharge to the aquatic environment. *J. Adv. Biol.* 4, 305–303. doi:10.24297/jab
- Flippin, J.L., Huggett, D., Foran, C.M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81, 73–8. doi:10.1016/j.aquatox.2006.11.002
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 45, 41–45. doi:10.1016/S0302-4598(98)00072-5
- Ghelfi, A., Ribas, J.L.C., Guiloski, I.C., Bettim, F.L., Piancini, L.D.S., Cestari, M.M., Pereira, A.J., Sasaki, G.L., Silva De Assis, H.C., 2016. Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 49–54. doi:10.1007/s00128-015-1693-3
- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 391–9. doi:10.3109/01480545.2013.870191
- Gravel, A., Wilson, J.M., Pedro, D.F.N., Vijayan, M.M., 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 149, 481–490. doi:10.1016/j.cbpc.2008.11.002
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W., Kloas, W., 2017. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 166, 473–481. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.116
- Guiloski, I.C., Piancini, L.D.S., Dagostin, A.C., Calado, S.L. de M., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2017a. Effects of environmentally relevant

- concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 291–300. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.053
- Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Piancini, L.D.S., Dagostim, A.C., Cirio, S.M., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., da Cunha, C., Silva de Assis, H.C., 2017b. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 53, 111–120. doi:10.1016/j.etap.2017.05.005
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. *J. Nutr.* 104, 747–753.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J.S., Zhang, X., Giesy, J.P., 2010. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–64. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.013
- Hayashi, Y., Heckmann, L.-H., Callaghan, A., Sibly, R.M., 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 17, 246–51. doi:10.1007/s10646-008-0191-3
- Hofman-Caris, C.H.M., Siegers, W.G., van de Merlen, K., de Man, A.W.A., Hofman, J.A.M.H., 2017. Removal of pharmaceuticals from WWTP effluent: Removal of EfOM followed by advanced oxidation. *Chem. Eng. J.* 327, 514–521. doi:10.1016/j.cej.2017.06.154
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., Dublán-García, O., 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5157–5166. doi:10.1007/s11356-013-2477-0
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J.P., Choi, K., 2013. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *J. Hazard. Mater.* 254–255, 242–251. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.036
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. *Chemosphere* 77, 518–525. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.041
- Komar, C.M., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - Implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue

- remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 1–14. doi:10.1186/1477-7827-3-41
- Lister, A.L., Van Der Kraak, G., 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159, 46–57. doi:10.1016/j.ygcen.2008.07.017
- Lolić, A., Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2015. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 508, 240–250. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.097
- Martinović-Weigelt, D., Mehinto, A.C., Ankley, G.T., Berninger, J.P., Collette, T.W., Davis, J.M., Denslow, N.D., Durhan, E.J., Eid, E., Ekman, D.R., Jensen, K.M., Kahl, M.D., LaLone, C.A., Teng, Q., Villeneuve, D.L., 2017. Derivation and evaluation of putative adverse outcome pathways for the effects of cyclooxygenase inhibitors on reproductive processes in female fish. *Toxicol. Sci.* 156, 344–361. doi:10.1093/toxsci/kfw257
- Mathias, F.T., Fockink, D.H., Disner, G.R., Prodocimo, V., Ribas, J.L.C., Ramos, L.P., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2018. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 59, 105–113. doi:10.1016/j.etap.2018.03.008
- Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R., 2010. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2176–2182. doi:10.1021/es903702m
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., De Oliveira Ribeiro, C.A., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.* 126, 17–29. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.007
- Morthorst, J.E., Lister, A., Bjerregaard, P., Der Kraak, G. Van, 2013. Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 157, 251–257. doi:10.1016/j.cbpc.2012.12.001
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234. doi:10.1007/s00216-006-1035-8
- Pamplona, J.H., Oba, E.T., da Silva, T.A., Ramos, L.P., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., Zamprônio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2011. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 342–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.09.010

- Pandey, P.K., Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Kumar, S., 2017. Evaluation of DNA damage and physiological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to sub-lethal diclofenac (DCF). *Aquat. Toxicol.* 186, 205–214. doi:10.1016/j.aquatox.2017.03.007
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1586–1594. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.025
- Patel, A., Panter, G.H., Trollope, H.T., Glennon, Y.C., Owen, S.F., Sumpter, J.P., Rand-Weaver, M., 2016. Testing the “ read-across hypothesis ” by investigating the effects of ibuprofen on fish. *Chemosphere* 163, 592–600. doi:doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.041
- Pereira, L.S., Ribas, J.L.C., Vicari, T., Silva, S.B., Stival, J., Baldan, A.P., Domingos, F.X.V., Grassi, M.T., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2016. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130, 29–36. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.046
- Quinn, B., Schmidt, W., Rourke, K.O., Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84, 657–663. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.033
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C., Stingo, V., 2010. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1530–1536. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.032
- Sanjuan-reyes, N., Gómez-oliván, L.M., Galar-martínez, M., García-medina, S., Islas-flores, H., González-gonzález, E.D., Cardoso-vera, J.D., Jiménez-vargas, J.M., 2015. Science of the Total Environment NSAID-manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ. J.* 531, 1–10. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.088
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Anal. Biochem.* 205, 192–205. doi:10.1016/0003-2697(68)90092-4
- Silva de Assis, H.C., Navarro-Martín, L., Fernandes, Leticia S. P. Cardoso, C.C., Pavoni, D.P., Trudeau, V.L., 2018. Cloning, sequencing and expression analysis of the neural form of P450 aromatase (cyp19a1b) in the South America catfish *Rhamdia quelen*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. Comparative biochemistry and physiology part B*. doi:10.1016/j.cbpb.2018.04.001
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Sorensen, P.W., Goetz, F.W., 1993. Pheromonal and reproductive function of F-prostaglandins and their metabolites in teleost fish. *J. Lipid Mediat.* 6, 385–393.

- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J. Hazard. Mater.* 344, 146–162. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.09.058
- Su, B., Landini, S., Davis, D.D., Brueggemeier, R.W., 2007. Synthesis and biological evaluation of selective aromatase expression regulators in breast cancer cells. *J. Med. Chem.* 50, 1635–1644. doi:10.1021/jm061133j
- Sun, J., Luo, Q., Wang, D., Wang, Z., 2015. Occurrences of pharmaceuticals in drinking water sources of major river watersheds, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 132–140. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.032
- Van Der Kraak, G., Chang, J.P., 1990. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 221–228. doi:10.1016/0016-6480(90)90306-7
- Vosges, M., Kah, O., Hinfrey, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarnous, Y., Porcher, J.M., Brion, F., 2012. 17 α -Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reprod. Toxicol.* 33, 198–204. doi:10.1016/j.reprotox.2011.04.005
- Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B.C., Combarnous, Y., Porcher, J.M., Kah, O., Brion, F., 2010. 17 α -Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 479–491. doi:10.1016/j.aquatox.2010.06.009
- Wade, M.G., Van Der Kraak, G., 1993. Arachidonic acid and prostaglandin E2 stimulate testosterone production by goldfish testis in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 90, 109–118. doi:10.1006/gcen.1993.1065
- Xia, L., Zheng, L., Zhou, J.L., 2017. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebra fish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 182, 416–425. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.054

4 DISCUSSÃO GERAL

O ibuprofeno foi o objeto de estudo desse trabalho com intuito de avaliar os possíveis efeitos tóxicos gerais e desreguladores endócrinos do fármaco em peixe neotropical *Rhamdia quelen*.

Para avaliação dos efeitos tóxicos gerais, foram analisadas respostas de biomarcadores no fígado, no rim posterior, na brânquia e no cérebro, além da análise hematológica das células de defesa. A avaliação dos biomarcadores bioquímicos em rim posterior demonstrou que ibuprofeno causou uma ativação do sistema antioxidante, evidenciado por alterações nas enzimas GPx, GST e nos níveis de GSH. Já nas brânquias e no fígado o fármaco não causou estresse oxidativo e nem ativação do sistema antioxidante. A ativação desse sistema nos tecidos depende da concentração do contaminante, da duração da exposição, bem como da suscetibilidade da espécie. Os efeitos do contaminante sobre o sistema antioxidante variaram conforme o órgão, e isso pode estar relacionado com diferenças de fluxo sanguíneo, o que resulta em concentrações diferentes de contaminante conforme o tecido avaliado (SLANINOVA et al., 2009).

A avaliação da osmorregulação nos rins e nas brânquias demonstrou que o ibuprofeno interferiu nesse importante processo para os peixes, e as alterações observadas podem estar relacionadas ao mecanismo de ação do ibuprofeno. As prostaglandinas regulam a osmorregulação em peixes (GRAVEL et al., 2009), estão envolvidas na biossíntese de cortisol, que atua estimulando a ação da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, necessária para a regulação de íons (CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010). A diminuição das prostaglandinas, promovida pela ação do fármaco, pode levar a desregulação dos processos controlados pelo cortisol e resultar em ações compensatórias alterando enzimas e íons (EVANS; CLAIBORNE, 2009). Em nosso estudo, houve alterações na atividade da enzima anidrase carbônica no rim posterior e nas brânquias, bem como alterações na concentração plasmática do íon magnésio. Particularmente, a inibição da anidrase carbônica renal observada, pode resultar em aumento nas perdas urinárias de Na^+ e HCO_3^- , resultando em desequilíbrio iônico e ácido-base, prejudicial para a homeostase dos peixes.

Em geral, o ibuprofeno demonstrou dano mais evidente no rim posterior em comparação com o fígado e as brânquias, evidenciado pelas respostas dos biomarcadores bioquímicos e de osmorregulação. Provavelmente não ocorreu genotoxicidade devido à ativação do sistema antioxidante. Outros estudos com AINEs também demonstram esse padrão de alterações renais (MEHINTO; HILL; TYLER, 2010; PAMPLONA et al., 2011;

GHELFI et al., 2016). Essas alterações podem estar relacionadas com o mecanismo de ação dos AINEs em humanos, onde a inibição das prostaglandinas afeta a homeostase renal, particularmente a filtração glomerular renal (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). O dado visualizado de aumento nas concentrações plasmáticas de magnésio pode ser um indício do comprometimento da filtração glomerular. Portanto, os efeitos do fármaco observados em rim posterior, podem ser resultantes da redução de prostaglandinas e consequente alteração na homeostase renal.

A análise hematológica demonstrou que o ibuprofeno teve efeito imunossupressor. Houve redução de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e trombócitos. Todas essas células tem função de defesa e combatem patógenos presentes no ambiente, atuando na imunidade inata e adquirida nos peixes (FISCHER et al., 2006; FERDOUS; SCOTT, 2015; NAGASAWA; SOMAMOTO; NAKAO, 2015). Essa redução observada predispõe o animal a doenças, comprometendo a habilidade de responder a infecções. O efeito imunossupressor do ibuprofeno também foi verificado *in vitro* na faixa de nanogramas (RIBAS et al., 2014) e para o AINE diclofenaco após exposição trófica em *Hoplias malabaricus* (RIBAS; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2016). Em mamíferos os AINEs podem inibir a função de células como neutrófilos, monócitos e plaquetas, por mecanismos independentes da redução de prostaglandinas (ABRAMSON; WEISSMANN, 1989). Para peixes, dados sobre como os AINEs interferem na imunidade ainda são escassos.

Avaliando ainda os efeitos tóxicos gerais, houve um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro dos animais expostos a concentração intermediária testada. Não foram observados efeitos comportamentais diferenciados nos peixes e os valores de atividade são semelhantes a outros estudos para *Rhamdia quelen* (MELA et al., 2013a, 2013b). Contudo, além do mecanismo de ação periférico (inibição da COX), os AINEs atuam no sistema nervoso central, diretamente em neurônios reduzindo sintomas de dor em condições inflamatórias (VOILLEY et al., 2001). Além disso, as prostaglandinas estão envolvidas na transmissão neural (GÓMEZ-OLIVÁN et al., 2014). Assim é possível que o ibuprofeno altere a atividade da AChE, uma vez que os AINEs exercem efeitos sobre o sistema nervoso central.

Um segundo ponto de avaliação desse estudo, foi verificar os possíveis efeitos do ibuprofeno como desregulador endócrino. Recentemente, ele foi classificado como tal em uma revisão de literatura sobre o tema (EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017). Contudo, ainda não se sabe por quais mecanismos o fármaco altera parâmetros reprodutivos e não existem muitos dados sobre seus efeitos em espécies neotropicais.

Os resultados demonstraram que o ibuprofeno diminuiu a expressão gênica da aromatase cerebral (*cyp19a1b*) de forma concentração dependente. Outros estudos que avaliaram os efeitos do ibuprofeno sobre a aromatase tiveram resultados diferentes dos encontrados no presente estudo. Avaliação do efeito do ibuprofeno *in vitro* demonstrou que o fármaco aumentou a atividade da enzima aromatase nas concentrações 0.2 e 2 mg/L (HAN et al., 2010). Ji et al. (2013) verificaram aumento da expressão da aromatase cerebral e gonadal em machos e fêmeas (*Danio rerio*) expostos ao ibuprofeno por 21 dias, na concentração de 10 µg/L. Contudo, os autores discutem que avaliando o mecanismo da ação do fármaco, é esperado que ocorresse uma diminuição de sua expressão, como foi observado em nosso estudo.

Essa observação está relacionada ao mecanismo de ação dos AINEs, que ao inibir a COX inibem a expressão da aromatase através de diferentes vias de sinalização. Em mamíferos, os AINEs ativam os receptores nucleares PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama) (KOMAR, 2005), pois estes regulam respostas inflamatórias, e essa ativação de PPAR γ inibe a expressão da enzima aromatase (FAN et al., 2005). Além disso, as prostaglandinas também estimulam a expressão do gene da aromatase através das vias de sinalização da proteína quinase A e C (SU et al., 2007) e sua diminuição pode também diminuir a expressão da aromatase. Os resultados dos efeitos dos AINEs sobre a expressão da aromatase ainda são controversos, mas é possível observar que variam conforme a espécie, a concentração e o tempo de exposição aos fármacos.

A análise dos hormônios testosterona e estradiol demonstrou que o ibuprofeno não alterou esses parâmetros. A *cyp19a1b* influencia de forma direta os níveis hormonais no cérebro, porém a diminuição de sua expressão poderia ter resultado em alterações hormonais no plasma, já que a enzima pode interferir na regulação do eixo HPGF. Em algumas espécies de peixes, como *Danio rerio* (VOSGES et al., 2010, 2012) e *Oncorhynchus mykiss* (BRETON; SOMBRONI, 1996) já foi demonstrado que níveis cerebrais de estrógenos, produtos da aromatização bem como os andrógenos aromatizáveis, estimulam a liberação do GnRH, o hormônio que inicia toda a regulação do eixo reprodutivo (FIGURA 3). Neste estudo, é possível que os 14 dias de exposição não foram suficientes para que a diminuição da expressão da aromatase cerebral interferisse na regulação do eixo HPGF, resultando na ausência de alterações nos níveis hormonais plasmáticos.

Os parâmetros histopatológicos avaliados na gônada e o IGS não foram alterados pelo ibuprofeno. Esses dados relacionam-se com a ausência de alterações hormonais que poderiam desencadear comprometimento nesses parâmetros (MARCHAND; PIETERSE;

BARNHOORN, 2008). A análise dos biomarcadores bioquímicos demonstrou uma diminuição da atividade da enzima GST, que está envolvida na biotransformação de xenobióticos (QUINN et al., 2011) e apresenta papel fundamental no metabolismo e na desintoxicação do ibuprofeno (MILAN et al., 2013). Seu decréscimo pode causar inibição na metabolização da droga e aumento de efeitos tóxicos. Não foi evidenciado ativação do sistema antioxidante e estresse oxidativo em gônada, o que está de acordo com a ausência de genotoxicidade no tecido.

Com esses resultados não foi possível concluir os mecanismos pelos quais o ibuprofeno afeta o sistema endócrino, mas foi possível observar que o fármaco apresenta um potencial efeito desregulador endócrino por interferir na expressão da aromatase cerebral. A diminuição da expressão dessa enzima pode resultar na diminuição de estrógenos no cérebro, e consequentemente comprometer funções locais desse hormônio como o comportamento sexual, a neurogênese e o reparo cerebral (CHESHENKO et al., 2008; BRETON et al., 2015). Além disso, pode resultar em alterações na regulação do eixo HPGF e nos níveis sistêmicos hormonais, com diversas consequências negativas ao sistema reprodutivo.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A exposição de *Rhamdia quelen* ao ibuprofeno em baixas concentrações demonstrou que o fármaco causou ativação do sistema antioxidante em rim posterior, comprometeu a osmorregulação, evidenciado pela diminuição da atividade da anidrase carbônica renal, aumento na atividade da anidrase carbônica branquial e aumento na concentração plasmática do íon magnésio. O fármaco causou ainda imunossupressão nos peixes, com redução das células de defesa e causou também aumento na atividade da acetilcolinesterase cerebral. O ibuprofeno não alterou o sistema antioxidante e a biotransformação na brânquia e no fígado, bem como não causou genotoxicidade no rim posterior e no fígado. Alterações morfológicas nucleares não foram observadas no sangue e o índice hepatossomático também não foi alterado. Em geral, os resultados demonstraram que o rim posterior foi o órgão mais impactado.

Na avaliação do fármaco como desregulador endócrino, foi demonstrado que o ibuprofeno diminuiu a expressão da enzima aromatase cerebral, mas não alterou os níveis dos hormônios testosterona e estradiol. A avaliação do tecido gonadal demonstrou que não houve alterações histopatológicas e no IGS, bem como não foi observada ativação do sistema antioxidante e genotoxicidade. Porém, o fármaco causou diminuição na biotransformação em gônada.

Os resultados demonstram que a presença do ibuprofeno na água em baixas concentrações, causa alterações em sistemas biológicos importantes, afetando a osmorregulação, tendo efeito imunossupressor e apresentado potencial efeito desregulador endócrino. Devido a frequente detecção do ibuprofeno em corpos hídricos, é necessário que sejam tomadas ações para monitoramento e controle do fármaco na água, para que os impactos sobre o meio ambiente sejam minimizados.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S. B.; WEISSMANN, G. The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Arthritis & Rheumatism**, v. 32, n. 1, p. 1–9, 1989.
- ADAMS, C.; LOFTIN, K. A.; ADAMS, C.; ASCE, M.; WANG, Y.; LOFTIN, K.; MEYER, M. Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. **Environmental Engineering**, v. 128, p. 253–260, 2002.
- ADÁN, C.; CORONADO, J. M.; BELLOD, R.; SORIA, J.; YAMAOKA, H. Photochemical and photocatalytic degradation of salicylic acid with hydrogen peroxide over TiO₂/SiO₂fibres. **Applied Catalysis A: General**, v. 303, n. 2, p. 199–206, 2006.
- AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 36–46, 2016.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, 1995.
- ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B.; SÁ JUNIOR, P. L.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; CARVALHO, R. G.; SOUZA, E. B.; STOCCO, R. C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies : A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.
- ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: Mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **The American Journal of Medicine**, v. 111, n. 1, p. 304–315, 2001.
- ATLI, G.; CANLI, M. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 8, p. 1861–1869, 2011.
- BARS, R.; FEGERT, I.; GROSS, M.; LEWIS, D.; WELTJE, L.; WEYERS, A.; WHEELER, J. R.; GALAY-BURGOS, M. Risk assessment of endocrine active chemicals: Identifying chemicals of regulatory concern. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 143–154, 2012.
- BECKER, A. G.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; SANTOS, D. R.; REICHERT, J. M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1734–1739, 2009.
- BEDNER, M.; MACCREHAN, W. A. Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 516–522, 2006.
- BERETTA, M.; BRITTO, V.; TAVARES, T. M.; DA SILVA, S. M. T.; PLETSCH, A. L. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil, **Journal of Soils and**

Sediments, v. 14, p. 1278–1286, 2014.

BERGMAN, A.; HEINDEL, J.; JOBLING, S.; KIDD, K.; ZOELLER, R. T. **State of the science of endocrine disrupting chemicals**. World Health Organization, 2012.

BEYER, J.; SANDVIK, M.; SK, J. U.; EGAAS, E.; HYLLAND, K.; WAAGBÙ, R.; GOKSÙ, A. Time and dose dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3,4,4,5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. **Biomarkers**, v. 2, p. 35–44, 1997.

BHANDARI, K.; VENABLES, B. Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, n. 2, p. 251–257, 2011.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251–1257, 2006.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. **Aquatic Sciences**, v. 65, n. 4, p. 320–341, 2003.

BOXALL, A. B.; RUDD, M.; BROOKS, B. W.; CALDWELL, D. J.; CHOI, K.; HICKMANN, S.; INNES, E.; OSTAPYK, K.; STAVELEY, J. P.; VERSLYCKE, T.; ANKLEY, G. T.; BEAZLEY, K. F. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 9, p. 1221–1229, 2012.

BRANDER, S. M. Thinking outside the box: Assessing endocrine disruption in aquatic life. In: AJUHA, S. (Ed.). **Monitoring Water Quality**. Wilmington: Elsevier, 2013. p. 104–145.

BRETON, B.; SAMBRONI, E. Steroid Activation of the brain–pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, p. 155–164, 1996.

BRETON, T. S.; DIMAGGIO, M. A.; SOWER, S. A.; BERLINSKY, D. L. Brain aromatase (cyp19a1b) and gonadotropin releasing hormone (gnrh2 and gnrh3) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (*Centropristis striata*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 181, p. 45–53, 2015.

BURGOS-ACEVES, M. A.; COHEN, A.; SMITH, Y.; FAGGIO, C. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 995–1000, 2018.

CALIMAN, F. A.; GAVRILESCU, M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. **Clean Soil, Air, Water**, v. 37, n. 4–5, p. 277–303, 2009.

CANONICA, S.; MEUNIER, L.; VON GUNTEN, U. Phototransformation of selected pharmaceuticals during UV treatment of drinking water. **Water Research**, v. 42, n. 1–2, p.

121–128, 2008.

CANTON, R.; WEINGARTNER, M.; FRACALOSSO, D. M.; FILHO, E. Z. Influência da frequência alimentar no desempenho de juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 749–753, 2007.

CARLSON, J. C.; STEFAN, M. I.; PARNIS, J. M.; METCALFE, C. D. Direct UV photolysis of selected pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in aqueous solution. **Water Research**, v. 84, p. 350–361, 2015.

CASADO, S.; ALONSO, M.; HERRADÓN, B.; TARAZONA, J. V.; NAVAS, J. M. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by carbaryl: Computational evidence of the ability of carbaryl to assume a planar conformation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3141–3147, 2006.

CAULIER, M.; BRION, F.; CHADILI, E.; TURIES, C.; PICCINI, B.; PORCHER, J. M.; GUIGUEN, Y.; HINFRAY, N. Localization of steroidogenic enzymes and Foxl2a in the gonads of mature zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 188, p. 96–106, 2015.

CHALLIS, J. K.; HANSON, M. L.; FRIESEN, K. J.; WONG, C. S. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 4, p. 672, 2014.

CHAMBERLAIN, E.; ADAMS, C. Oxidation of sulfonamides, macrolides, and carbadox with free chlorine and monochloramine. **Water Research**, v. 40, n. 13, p. 2517–2526, 2006.

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C. C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 101–115, 2005.

CHESHENKO, K.; PAKDEL, F.; SEGNER, H.; KAH, O.; EGGEN, R. I. L. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 31–62, 2008.

CHOE, K. P.; HAVIRD, J.; ROSE, R.; HYNDMAN, K.; PIERMARINI, P.; EVANS, D. H. COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 9, p. 1696–1708, 2006.

CHRISTENSEN, F. M. Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 212–221, 1998.

CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETTLAR, A. I. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 3, p. 302–319, 2002.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 445–462, 2008.

COLLADO, N.; BUTTIGLIERI, G.; FERRANDO-CLIMENT, L.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; COMAS, J.; RODRIGUEZ-RODA, I. Removal of ibuprofen and its transformation products: Experimental and simulation studies. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 296–301, 2012.

CORCORAN, J.; WINTER, M. J.; TYLER, C. R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 287–304, 2010.

COUMAILLEAU, P.; PELLEGRINI, E.; ADRIO, F.; DIOTEL, N.; CANO-NICOLAU, J.; NASRI, A.; VAILLANT, C.; KAH, O. Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 2, p. 152–162, 2015.

CUKLEV, F.; KRISTIANSSON, E.; FICK, J.; ASKER, N.; FÖRLIN, L.; LARSSON, D. G. J. Diclofenac in fish: Blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 2126–2134, 2011.

CUNNINGHAM, V. L.; BINKS, S. P.; OLSON, M. J. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39–45, 2009.

DANG, Z. Fish biomarkers for regulatory identification of endocrine disrupting chemicals. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 266–270, 2014.

DAOUK, S.; CHÈVRE, N.; VERNAZ, N.; BONNABRY, P.; DAYER, P.; DAALI, Y.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. **Journal of Environmental Management**, v. 160, p. 324–332, 2015.

DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals as environmental pollutants: The ramifications for human exposure. In: HEGGENHOUGEN, K.; QUAH, S. (Ed.). **International Encyclopedia of Public Health**. Oxford: Academic Press, 2008. 5p. 66–102.

DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 391–426, 2016.

DAVID, A.; LANGE, A.; ABDUL-SADA, A.; TYLER, C. R.; HILL, E. M. Disruption of the prostaglandin metabolome and characterization of the pharmaceutical exposome in fish exposed to wastewater treatment works effluent as revealed by nanoflow-nanospray mass spectrometry-based metabolomics. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 616–624, 2017.

DAVID, A.; PANCHARATNA, K. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 390–395, 2009.

DI GIULIO, R.; MEYER, J. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.; HINTON, D. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**. 17. ed. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008. p. 273–324.

DIOTEL, N.; LE, Y.; MOURIEC, K.; TONG, S.; PELLEGRINI, E.; VAILLANT, C.; ANGLADE, I.; BRION, F.; PAKDEL, F.; CHUNG, B.; KAH, O. Frontiers in Neuroendocrinology Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p. 172–192, 2010.

DODD, M. C.; HUANG, C. H. Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: Reaction kinetics and pathways. **Water Research**, v. 41, n. 3, p. 647–655, 2007.

DONNACHIE, R. L.; JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 1021–1027, 2016.

DOUGHERTY, J. A.; SWARZENSKI, P. W.; DINICOLA, R. S.; REINHARD, M. Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around liberty bay, puget sound, Washington. **Journal of Environment Quality**, v. 39, n. 4, p. 1173, 2010.

DUFFY, T. A.; IWANOWICZ, L. R.; MCCORMICK, S. D.; DUFFY, T.A., L.R. IWANOWICZ, S. D. M. Comparative responses to endocrine disrupting compounds in early life stages of Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 1–10, 2014.

EBELE, A. J.; ABOU-ELWAFA ABDALLAH, M.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.

ESTEBAN, M.; CUESTA, A.; CHAVES-POZO, E.; MESEGUER, J. Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. **Biology**, v. 4, p. 907–922, 2015.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. Osmotic and ionic regulation in fishes. In: EVANS, D. H. (Ed.). **Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals**. New York: CRC Press, 2009. p. 295–366.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-Base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

FAN, W.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; MU, Y.-M.; NOMURA, M.; OKABE, T.; GOTO, K.; HARADA, N.; NAWATA, H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor- κ B. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 85–92, 2005.

FANG, T. H.; NAN, F. H.; CHIN, T. S.; FENG, H. M. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1435–

1444, 2012.

FENT, K.; ESCHER, C.; CAMINADA, D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 175–85, 2006.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERDOUS, F.; SCOTT, T. R. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 32–39, 2015.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; VALDEHITA, A.; ALONSO, M.; MANN, E.; HERRADÓN, B.; NAVAS, J. M. Biological and chemical studies on aryl hydrocarbon receptor induction by the p53 inhibitor pifithrin- α and its condensation product pifithrin- β . **Life Sciences**, v. 88, n. 17–18, p. 774–783, 2011.

FERRANDO-CLIMENT, L.; COLLADO, N.; BUTTIGLIERI, G.; GROS, M.; RODRIGUEZ-RODA, I.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 404–413, 2012.

FERREIRA, A. P. Identification and quantification of ibuprofen in conventional wastewater treatment plants in Rio de Janeiro, Brazil and their discharge to the aquatic environment. **Journal of Advances in Biology**, v. 4, n. 1, p. 305–303, 2014.

FISCHER, U.; UTKE, K.; SOMAMOTO, T.; KÖLLNER, B.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 209–226, 2006.

FLIPPIN, J. L.; HUGGETT, D.; FORAN, C. M. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 73–8, 15 fev. 2007.

FORLANO, P. M.; DEITCHER, D. L.; MYERS, D. A.; BASS, A. H. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 22, p. 8943–8955, 2001.

FRISCHE, T.; BACHMANN, J.; FREIN, D.; JUFFERNHOLZ, T.; KEHRER, A.; KLEIN, A.; MAACK, G.; STOCK, F.; STOLZENBERG, H. C.; THIERBACH, C.; WALTER-ROHDE, S. Identification, assessment and management of “endocrine disruptors” in wildlife in the EU substance legislation-Discussion paper from the German Federal Environment Agency (UBA). **Toxicology Letters**, v. 223, n. 3, p. 306–309, 2013.

FUJIMORI, C.; OGIWARA, K.; HAGIWARA, A.; RAJAPAKSE, S.; KIMURA, A.; TAKAHASHI, T. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: Possible involvement in ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 332, n. 1–2, p. 67–77, 2011.

GAGNON, M. M.; RAWSON, C. A. Integrating Multiple Biomarkers of Fish Health: A Case Study of Fish Health in Ports. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 2, p. 192–203, 2016.

GHELFI, A.; RIBAS, J. L. C.; GUILOSKI, I. C.; BETTIM, F. L.; PIANCINI, L. D. S.; CESTARI, M. M.; PEREIRA, A. J.; SASSAKI, G. L.; SILVA DE ASSIS, H. C. Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 49–54, 2016.

GILROY, È. A. M.; BALAKRISHNAN, V. K.; SOLOMON, K. R.; SVERKO, E.; SIBLEY, P. K. Behaviour of pharmaceuticals in spiked lake sediments - Effects and interactions with benthic invertebrates. **Chemosphere**, v. 86, n. 6, p. 578–584, 2012.

GLASSMEYER, S. T.; HINCHEY, E. K.; BOEHME, S. E.; DAUGHTON, C. G.; RUHOY, I. S.; CONERLY, O.; DANIELS, R. L.; LAUER, L.; MCCARTHY, M.; NETTESHEIM, T. G.; SYKES, K.; THOMPSON, V. G. Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. **Environment International**, v. 35, n. 3, p. 566–72, abr. 2009.

GOMES, L. de C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

GÓMEZ-ABELLÁN, V.; SEPULCRE, M. P. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. **Molecular Immunology**, v. 69, p. 139–145, 2016.

GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; VALDÉS-ALANÍS, A.; ISLAS-FLORES, H.; NERI-CRUZ, N. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 391–9, 2014.

GÓMEZ, M. J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, a R.; AGÜERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 993–1002, jan. 2007.

GONÇALVES, D.; TELES, M.; ALPEDRINHA, J.; OLIVEIRA, R. F. Brain and gonadal aromatase activity and steroid hormone levels in female and polymorphic males of the peacock blenny *Salaria pavo*. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 5, p. 717–725, 2008.

GONZÁLEZ, A.; PIFERRER, F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 223–230, 2003.

GOTO-KAZETO, R.; KIGHT, K. E.; ZOHAR, Y.; PLACE, A. R.; TRANT, J. M. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 72–84, 2004.

GOVIND, P. A review of fish model in experimental pharmacology. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 9, p. 33–36, 2011.

GRAVEL, A.; WILSON, J. M.; PEDRO, D. F. N.; VIJAYAN, M. M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology , Part C**, v. 149, n. 4, p. 481–490, 2009.

GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; PIFERRER, F.; CHANG, C. F. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 352–366, 2010.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PEREIRA, L. da S.; NEVES, A. P. P.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 204–211, 2015.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CIRIO, S. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; DA CUNHA, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 111–120, 2017.

GURNEY, W. S. C. Modeling the demographic effects of endocrine disruptors. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 122–126, 2006.

HACHFI, L.; COUVRAY, S.; SIMIDE, R.; TARNOWSKA, K.; PIERRE, S.; GAILLARD, S.; RICHARD, S.; COUPÉ, S.; GRILLASCA, J.-P.; PRÉVOT-D'ALVISE, N. Impact of endocrine disrupting chemicals [EDCs] on hypothalamic-pituitary-gonad-liver [HPGL] axis in fish. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 4, n. 1, p. 14–30, 2012.

HAN, E. J.; LEE, D. S. Significance of metabolites in the environmental risk assessment of pharmaceuticals consumed by human. **Science of the Total Environment**, v. 592, p. 600–607, 2017.

HAN, S.; CHOI, K.; KIM, J.; JI, K.; KIM, S.; AHN, B.; YUN, J.; CHOI, K.; KHIM, J. S.; ZHANG, X.; GIESY, J. P. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 256–64, 2010.

HAYASHI, Y.; HECKMANN, L.-H.; CALLAGHAN, A.; SIBLY, R. M. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 4, p. 246–51, 2008.

HINFRAY, N.; SOHM, F.; CAULIER, M.; CHADILI, E.; PICCINI, B.; TORCHY, C.; PORCHER, J. M.; GUIGUEN, Y.; BRION, F. Dynamic and differential expression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line. **General and Comparative Endocrinology**, v. 261, p. 1–11, 2017.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BACHMAKOV, J.; RENNER, B.; ZOLK, O.; FROMM, M. F.; BRUNE, K. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **FASEB Journal**, v. 21, n.

10, p. 2343–51, 2007.

HIRAMATSU, N.; TODO, T.; SULLIVAN, C. V.; SCHILLING, J.; READING, B. J.; MATSUBARA, T.; RYU, Y. W.; MIZUTA, H.; LUO, W.; NISHIMIYA, O.; WU, M.; MUSHIROBIRA, Y.; YILMAZ, O.; HARA, A. Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, p. 9–15, 2015.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E.; SCIENCES, O. H. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327–341, 2014.

HUSSAIN, B.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; MASOUD, M. S.; AHMED, Z.; MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 393–398, 2017.

HUSSAIN, S.; SLIKKER, W.; ALI, S. F. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 2, p. 145–152, 1996.

HUTCHINSON, T. H.; ANKLEY, G. T.; SEGNER, H.; TYLER, C. R. Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish—Biomarkers As “Signposts,” Not “Traffic Lights,” in Risk Assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 106–114, 2005.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 148, n. 3, p. 479–497, 2007.

IKEHATA, K.; JODEIRI NAGHASHKAR, N.; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, n. 6, p. 353–414, 2006.

IMS INSTITUTE FOR HEALTHCARE INFORMATICS. **The Global Use of Medicines : Outlook through**, 2017.

ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; NERI-CRUZ, N.; DUBLÁN-GARCÍA, O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 7, p. 5157–5166, 2014.

JEFFRIES, K. M.; BRANDER, S. M.; BRITTON, M. T.; FANGUE, N. A.; CONNON, R. E. Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17397–17413, 2015.

JI, K.; LIU, X.; LEE, S.; KANG, S.; KHO, Y.; GIESY, J. P.; CHOI, K. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 254–255, n. 1, p. 242–251, 2013.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J. H.; VAN GENT, D. C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 1989, p. 483–489, 1998.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. a. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 715–40, 1996.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2008.

KERAMBRUN, E.; SANCHEZ, W.; HENRY, F.; AMARA, R. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 154, n. 3, p. 187–195, 2011.

KIDD, K. A.; BLANCHFIELD, P. J.; MILLS, K. H.; PALACE, V. P.; EVANS, R. E.; LAZORCHAK, J. M.; FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. **Chemosphere**, v. 77, n. 4, p. 518–525, 2009.

KIYAMA, R.; WADA-KIYAMA, Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**, v. 83, p. 11–40, 2015.

KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, M.; SUNOBE, T.; MORREY, C. E.; SUZUKI, N.; NAGAHAMA, Y. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. **Zoological Science**, v. 21, n. 4, p. 417–425, 2004.

KÖLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISCHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - how can environmental influences be detected? **Toxicology Letters**, v. 131, n. 2002, p. 83–95, 2008.

KOMAR, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - Implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–14, 2005.

KOTULA-BALAK, M.; ZIELIŃSKA, R.; GLOGOWSKI, J.; KOWALSKI, R. K.; SAROSIEK, B.; BILIŃSKA, B. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 149, n. 2, p. 188–196, 2008.

KUMAR, P.; SOORAMBAIL K., S.; HARISINGH, S. B.; D'COSTA, A.; CHANDRA, C. R.

The effect of gamma radiation on the common carp (*Cyprinus carpio*): In vivo genotoxicity assessment with the micronucleus and comet assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 792, p. 19–25, 2015.

KUSTER, M.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.

LALUMERA, G. M.; CALAMARI, D.; GALLI, P.; CASTIGLIONI, S.; CROSA, G.; FANELLI, R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, v. 54, n. 5, p. 661–668, 2004.

LANGFORD, K. H.; THOMAS, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 766–770, 2009.

LARSSON, D. G. J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 3, p. 751–5, 2007.

LE, T. X.; MUNEKAGE, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 11–12, p. 922–929, 2004.

LEINO, R. L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G. T. Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 2005.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; ERROI, E.; SCHETTINO, T. Carbonic anhydrase as pollution biomarker: An ancient enzyme with a new use. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 11, p. 3965–3977, 2012.

LIONETTO, M. G.; GIORDANO, M. E.; VILELLA, S.; SCHETTINO, T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 561–571, 2000.

LISTER, A. L.; VAN DER KRAAK, G. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 46–57, 2008.

LOLIĆ, A.; PAÍGA, P.; SANTOS, L. H. M. L. M.; RAMOS, S.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 240–250, 2015.

LOUIZ, I.; BEN-ATTIA, M.; BEN-HASSINE, O. K. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. **Fisheries Research**, v. 100, n. 3, p. 266–273, 2009.

MAGNADÓTIRR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137–151, 2006.

MARCHAND, M. J.; PIETERSE, G. M.; BARNHOORN, I. E. J. Preliminary results on sperm motility and testicular histology of two feral fish species, *Oreochromis mossambicus* and *Clarias gariepinus*, from a currently DDT-sprayed area, South Africa. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 423–429, 2008.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid–base balance. In: **The Physiology of Fishes**. Four ed. New York: CRC Press, 2006. 3p. 179–214.

MARTÍN, J.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 12, p. 1760–1766, 2010.

MEHINTO, A. C.; HILL, E. M.; TYLER, C. R. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 2176–2182, 2010.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RABITTO, I. S.; DA SILVA, C. A.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108–116, 2013a.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RANDI, M. A. F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13–21, 2013b.

MEUNIER, L.; CANONICA, S.; VON GUNTEN, U. Implications of sequential use of UV and ozone for drinking water quality. **Water Research**, v. 40, n. 9, p. 1864–1876, 2006.

MILAN, M.; PAULETTO, M.; PATARNELLO, T.; BARGELLONI, L.; MARIN, M. G.; MATOZZO, V. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 17–29, 2013.

MILES-RICHARDSON, S. R.; PIERENS, S. L.; NICHOLS, K. M.; KRAMER, V. J.; SNYDER, E. M.; SNYDER, S. A.; RENDER, J. A.; FITZGERALD, S. D.; GIESY, J. P. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, v. 47, p. 129–145, 1999.

MILNES, M. R.; BERMUDEZ, D. S.; BRYAN, T. A.; EDWARDS, T. M.; GUNDERSON, M. P.; LARKIN, I. L. V.; MOORE, B. C.; GUILLETTE, L. J. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. **Environmental Research**, v. 100, n. 1, p. 3–17, 2006.

MIURA, T.; MIURA, C.; OHTA, T.; NADER, M. R.; TODO, T.; YAMAUCHI, K. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, n. 1, p. 230–234, 1999.

MIURA, T.; OHTA, T.; MIURA, C. I.; YAMAUCHI, K. Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning of Spermatogonial Stem Cell Renewal Factor. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5504–5510, 2003.

MIZUKAWA, A. **Avaliação de contaminantes emergentes na água e sedimento na bacia do Alto Iguaçu/PR**. Tese de Doutorado. Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental. Universidade Federal do Paraná, 2016.

MIZUTA, H.; LUO, W.; ITO, Y.; MUSHIROBIRA, Y.; TODO, T.; HARA, A.; READING, B. J.; SULLIVAN, C. V.; HIRAMATSU, N. Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 166, n. 1, p. 81–90, 2013.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; LUND AMADO, L.; MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; LOPES LEÃES PINHO, G.; SOARES CHAVES, I.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 221–234, 2007.

MONTEIRO, S. C.; BOXALL, A. B. A. Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment Sara. In: WHITACRE, D. M. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2010. 202p. 53–154.

MORTHORST, J. E.; LISTER, A.; BJERREGAARD, P.; VAN DER KRAAK, G. Ibuprofen reduces zebrafish PGE₂ levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 157, n. 2, p. 251–257, 2013.

MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 104–108, 2011.

NAGASAWA, T.; SOMAMOTO, T.; NAKAO, M. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 52, n. 2, p. 107–111, 2015.

NAGLER, J. J.; DAVIS, T. L.; MODI, N.; VIJAYAN, M. M.; SCHULTZ, I. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 2, p. 326–330, 2010.

NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. .; ROMAGOSA, E. Tipo de desova e fecundidade do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 16, n. 1, p. 37–45, 1989.

NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 3, p. 123–137, 1985.

NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 807–825, 2001.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1225–1234, 2007.

NOWOTNY, N.; EPP, B.; SONNTAG, C. VON; FAHLENKAMP, H. Quantification and Modeling of the Elimination Behavior of Ecologically Problematic Wastewater Micropollutants by Adsorption on Powdered and Granulated Activated Carbon. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 6, p. 45–71, 2007.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. **Chemosphere**, v. 57, n. 11, p. 1581–1589, 2004.

OLIVEIRA, E.; BARATA, C.; PIÑA, B. Endocrine disruption in the omics : new views, new hazards, new approaches. **The Open Biotechnology Journal**, v. 9, p. 20–35, 2015.

OLIVEIRA, N.; OLIVEIRA, J.; KLIGERMAN, D. C.; LACERDA, P. Revisão dos dispositivos legais e normativos internacionais e nacionais sobre gestão de medicamentos e de seus resíduos. **Ciência e Saúde Coletiva**, 2017. Disponível em: <<http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/revisao-dos-dispositivos-legais-e-normativos-internacionais-e-nacionais-sobre-gestao-de-medicamentos-e-de-seus-residuos/16331?id=16331>>. Acesso em: 30 de jan. 2018

ONESIOS, K. M.; YU, J. T.; BOUWER, E. J. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: A review. **Biodegradation**, v. 20, n. 4, p. 441–466, 2009.

ORLANDO, E. F.; GUILLETTE, L. J. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 163–173, 2007.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; DA SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 342–9, 2011.

PARK, C. B.; AOKI, J. ya; LEE, J. S.; NAGAE, M.; LEE, Y. D.; SAKAKURA, Y.; HAGIWARA, A.; SOYANO, K. The effects of 17 β -estradiol on various reproductive parameters in the hermaphrodite fish *Kryptolebias marmoratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 273–279, 2010.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74,

n. 6, p. 1586–1594, 2011.

PATEL, A.; PANTER, G. H.; TROLLOPE, H. T.; GLENNON, Y. C.; OWEN, S. F.; SUMPTER, J. P.; RAND-WEAVER, M. Testing the “read-across hypothesis” by investigating the effects of ibuprofen on fish. **Chemosphere**, v. 163, p. 592–600, 2016.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, D. A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548, p.148–154, 2016a.

PEREIRA, L. S.; RIBAS, J. L. C.; VICARI, T.; SILVA, S. B.; STIVAL, J.; BALDAN, A. P.; DOMINGOS, F. X. V.; GRASSI, M. T.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 29–36, 2016b.

POUNDS, N.; MACLEAN, S.; WEBLEY, M.; PASCOE, D.; HUTCHINSON, T. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 1, p. 47–52, 2008.

PRODOCIMO, V.; SINZKER, R. C.; STREY, L.; FREIRE, C. A. Physiological biomarkers in a resident and a non-resident estuarine teleosts species: a comparison between fish from an industrially impacted site and a non-impacted site. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 48, n. 2, p. 117–134, 2015.

QUERO-PASTOR, M.; VALENZUELA, A.; QUIROGA, J. M.; ACEVEDO, A. Degradation of drugs in water with advanced oxidation processes and ozone. **Journal of Environmental Management**, v. 137, p. 197–203, 2014.

QUESADA-GARCÍA, A.; VALDEHITA, A.; TORRENT, F.; VILLARROEL, M.; HERNANDO, M. D.; NAVAS, J. M. Use of fish farms to assess river contamination: Combining biomarker responses, active biomonitoring, and chemical analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 439–448, 2013.

QUINN, B.; SCHMIDT, W.; ROURKE, K. O.; HERNAN, R. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 657–663, 2011.

RAMALLO, M. R.; MORANDINI, L.; BIRBA, A.; SOMOZA, G. M.; PANDOLFI, M. From molecule to behavior: Brain aromatase (cyp19a1b) characterization, expression analysis and its relation with social status and male agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish. **Hormones and Behavior**, v. 89, p. 176–188, 2017.

REYNAUD, S.; RAVETON, M.; RAVANEL, P. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 139–145, 2008.

RIBALTA, C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; SOLE, M. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. **Science of**

the **Total Environment**, v. 532, p. 176–183, 2015.

RIBAS, J. L. C.; DA SILVA, C. A.; DE ANDRADE, L.; GALVAN, G. L.; CESTARI, M. M.; TRINDADE, E. S.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 296–303, 2014.

RIBAS, J. L. C.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 975–982, 2016.

RODRIGUES, K. L. T.; SANSON, A. L.; QUARESMA, A.V.; GOMES, R. P.; DA SILVA, G. A.; AFONSO, R. J. C. F. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242–249, 2014.

RODRÍGUEZ-MARÍ, A.; YAN, Y. L.; BREMILLER, R. A.; WILSON, C.; CAÑESTRO, C.; POSTLETHWAIT, J. H. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. **Gene Expression Patterns**, v. 5, n. 5, p. 655–667, 2005.

ROSARIO-ORTIZ, F. L.; WERT, E. C.; SNYDER, S. A. Evaluation of UV/H₂O₂ treatment for the oxidation of pharmaceuticals in wastewater. **Water Research**, v. 44, n. 5, p. 1440–1448, 2010.

SAGLAM, D.; ATLI, G.; CANLI, M. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 79–86, 2013.

SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, p. 84–90, 2012.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95, 2010.

SANTOS, L. H. M. L. M.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DELERUE-MATOS, C.; PENA, A.; BARCELÓ, D.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **The Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 302–16, 2013.

SARAVANAN, M.; DEVI, K. U.; MALARVIZHI, A.; RAMESH, M. Effects of ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 14–22, 2012.

SARAVANAN, M.; KARTHIKA, S.; MALARVIZHI, A.; RAMESH, M. Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings:

Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 188–194, 2011.

SCHETTLER, T.; SOLOMON, G.; VALENTI, M.; HUDDLE, A. **Generations at Risk: Reproductive Health and the Environment**. London: MIT Press, 2000.

SCHWAB, B. W.; HAYES, E. P.; FIORI, J. M.; MASTROCCO, F. J.; RODEN, N. M.; CRAGIN, D.; MEYERHOFF, R. D.; D'ACO, V. J.; ANDERSON, P. D. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 296–312, 2005.

SILVA, A. O. F.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 161–168, 2014.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters**, v. 30, p. 2–12, 2009.

SMIT, M. G. D.; BECHMANN, R. K.; HENDRIKS, A. J.; SKADSHEIM, A.; LARSEN, B. K.; BAUSSANT, T.; BAMBER, S.; SANNI, S. Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: a pilot study for marine species exposed to oil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 1104–1109, 2009.

SOLÉ, M.; SHAW, J. P.; FRICKERS, P. E.; READMAN, J. W.; HUTCHINSON, T. H. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 649–656, 2010.

SORENSEN, P. W.; GOETZ, F. W. Pheromonal and reproductive function of F-prostaglandins and their metabolites in teleost fish. **Journal of Lipid Mediators**, v. 6, p. 385–393, 1993.

SOUSA, J. C. G.; RIBEIRO, A. R.; BARBOSA, M. O.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 146–162, 2018.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 18, p. 1–20, 2018.

SU, B.; LANDINI, S.; DAVIS, D. D.; BRUEGGEMEIER, R. W. Synthesis and biological evaluation of selective aromatase expression regulators in breast cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1635–1644, 2007.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, n. 16, p. 173–8, 1995.

SUN, J.; LUO, Q.; WANG, D.; WANG, Z. Occurrences of pharmaceuticals in drinking water sources of major river watersheds, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 132–140, 2015.

SWANSON, P.; DICKEY, J. T.; CAMPBELL, B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1–4, p. 53–59, 2003.

TERNES, T. A.; STÜBER, J.; HERRMANN, N.; MCDOWELL, D.; RIED, A.; KAMPMANN, M.; TEISER, B. Ozonation: A tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? **Water Research**, v. 37, n. 8, p. 1976–1982, 2003.

TERRADAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 4, p. 252–266, 2002.

TONG, S. K.; MOURIEC, K.; KUO, M. W.; PELLEGRINI, E.; GUEGUEN, M. M.; BRION, F.; KAH, O.; CHUNG, B. C. A cyp19a1b-GFP (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. **Genesis**, v. 47, n. 2, p. 67–73, 2009.

TOPP, E.; MONTEIRO, S. C.; BECK, A.; COELHO, B. B.; BOXALL, A. B. a; DUENK, P. W.; KLEYWEGT, S.; LAPEN, D. R.; PAYNE, M.; SABOURIN, L.; LI, H.; METCALFE, C. D. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. **The Science of the Total Environment**, v. 396, n. 1, p. 52–59, 2008.

TRUDEAU, V. L.; METCALFE, C. D.; MIMEAULT, C.; MOON, T. W. Pharmaceuticals in the environment : Drugged fish ? In: MOMMSEN, T. P.; W., M. T. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Canada:Elsevier, 2005. 6p. 475–493.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 148, n. 4, p. 419–429, 2008.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.

VAN DER KRAAK, G.; CHANG, J. P. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 77, n. 2, p. 221–228, 1990.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. **Environmental Toxicology and**

Pharmacology, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VERLIEFDE, A. R. D.; CORNELISSEN, E. R.; HEIJMAN, S. G. J.; PETRINIC, I.; LUXBACHER, T.; AMY, G. L.; VAN DER BRUGGEN, B.; VAN DIJK, J. C. Influence of membrane fouling by (pretreated) surface water on rejection of pharmaceutically active compounds (PhACs) by nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 330, n. 1–2, p. 90–103, 2009.

VIÑAS, J.; PIFERRER, F. Stage-Specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Gonads. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 4, p. 738–747, 2008.

VOILLEY, N.; WEILLE, J. De; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8026–8033, 2001.

VON SCHALBURG, K. R.; GOWEN, B. E.; RONDEAU, E. B.; JOHNSON, N. W.; MINKLEY, D. R.; LEONG, J. S.; DAVIDSON, W. S.; KOOP, B. F. Sex-specific expression, synthesis and localization of aromatase regulators in one-year-old Atlantic salmon ovaries and testes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 164, n. 4, p. 236–246, 2013.

VOSGES, M.; KAH, O.; HINFRAY, N.; CHADILI, E.; LE PAGE, Y.; COMBARNOUS, Y.; PORCHER, J. M.; BRION, F. 17 α -Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 198–204, 2012.

VOSGES, M.; LE PAGE, Y.; CHUNG, B. C.; COMBARNOUS, Y.; PORCHER, J. M.; KAH, O.; BRION, F. 17 α -Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 4, p. 479–491, 2010.

WADE, M. G.; VAN DER KRAAK, G. Arachidonic acid and prostaglandin E2 stimulate testosterone production by goldfish testis in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v. 90, p. 109–118, 1993.

WILKINSON, J. L.; HOODA, P. S.; BARKER, J.; BARTON, S.; SWINDEN, J. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 336–381, 2016.

WINSTON, G. W.; GIULIOZ, R. T. Di. Prooxidant and oxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137–161, 1991.

WONG, C. M.; MARCOCCI, L.; LIU, L.; SUZUKI, Y. J. Cell Signaling by Protein Carbonylation and Decarbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 393–404, 2010.

XIA, K.; BHANDARI, A.; DAS, K.; PILLAR, G. Occurrence and Fate of Pharmaceuticals

and Personal Care Products (PPCPs) in Biosolids. **Journal of Environment Quality**, v. 34, n. 1, p. 91, 2005.

XIA, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebra fish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 182, p. 416–425, 2017.

YAMAMOTO, F. Y.; GARCIA, J. R. E.; KUPSCO, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. **Chemosphere**, v. 186, p. 88–99, 2017.

YAMAMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; MORIGUCHI, S.; NAKAMURA, Y.; HONDA, Y.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; HAYASHI, A.; SEKIZAWA, J. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 351–362, 2009.

YARGEAU, V.; LECLAIR, C. Impact of operating conditions on decomposition of antibiotics during ozonation: A review. **Ozone: Science and Engineering**, v. 30, n. 3, p. 175–188, 2008.

YEH, H. C.; WANG, L. H. Profiling of prostanoids in zebrafish embryonic development. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 6, p. 397–402, 2006.

YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; SNYDER, S. A.; WERT, E. C. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. **Journal of Membrane Science**, v. 270, n. 1–2, p. 88–100, 2006.

ZAPATA, L. M.; BOCK, B. C.; OROZCO, L. Y.; PALACIO, J. A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108–116, 2016.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 167–174, 2004.

ZHANG, Y.; ZHANG, W.; YANG, H.; ZHOU, W.; HU, C.; ZHANG, L. Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*: mRNA expression during ovarian development and sex change. **Journal of Endocrinology**, v. 199, n. 2, p. 317–331, 2008.

ZWIENER, C.; SEEGER, S.; GLAUNER, T.; FRIMMEL, F. H. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 4, p. 569–575, 2002.